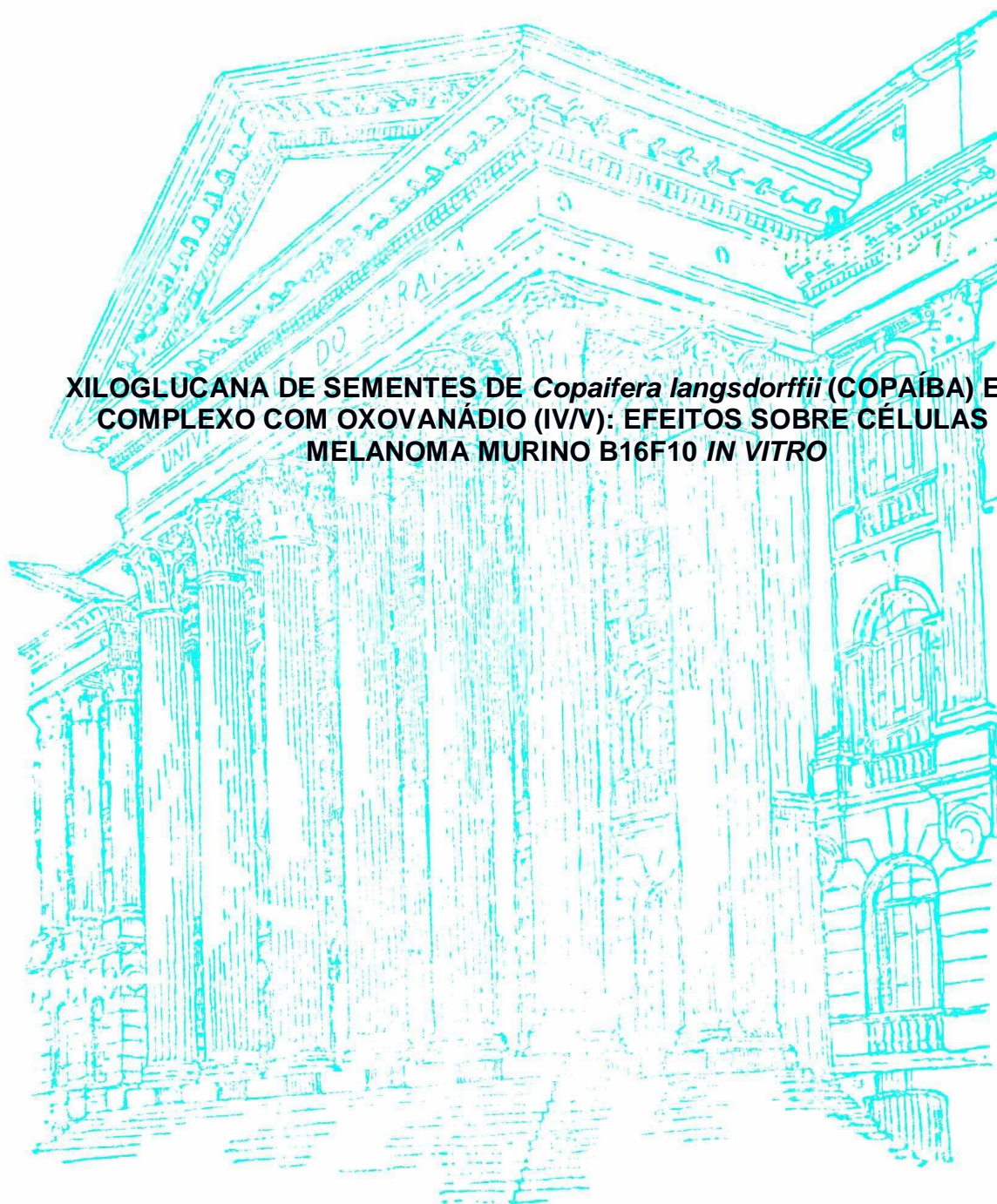


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA LANE ALVES FARIAS

XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU  
COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V): EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO B16F10 *IN VITRO*



CURITIBA  
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CAROLINA LANE ALVES FARIAS**

**XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU  
COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V): EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO B16F10 *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Guilhermina Rodrigues Noletto

Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Regina Martinez e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia M. S. C. Cadena

**CURITIBA  
2012**

Aos meus pais, Antônio e Nágela, por todo o amor, carinho e dedicação e aos meus irmãos Marcio e Marcelo, por estarem sempre ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por iluminar meus caminhos, me dar sabedoria, força e oportunidades;

Aos meus pais, Antônio e Nágela, que sempre estão ao meu lado me acompanhando em todos os momentos, me apoiando e me dando forças. Obrigada por tudo o que vocês me oferecem e por não medirem esforços para que eu realize os meus sonhos. Sem vocês ao meu lado eu nada conseguiria;

Aos meus queridos irmãos, Marcio e Marcelo, obrigada por serem os irmãos mais maravilhosos do mundo, por sempre estarem comigo e me darem ânimo nos momentos mais difíceis;

À toda minha família, obrigada pelo amor, por acreditarem em mim e, mesmo distante, estarem sempre na torcida para que eu realize meus sonhos;

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Guilhermina, inicialmente por me aceitar como aluna. Obrigada pela orientação, atenção, paciência e carinho;

À prof<sup>a</sup> Gláucia, muito obrigada pela co-orientação, pelas idéias sempre bem vindas, pelo apoio e ajuda em todos os momentos que eu precisei;

À prof<sup>a</sup> Silvia, obrigada também pela co-orientação;

Às demais professoras do grupo de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, por serem sempre tão prestativas e atenciosas;

Aos amigos do laboratório que sempre estavam dispostos a dedicar um pouquinho do seu tempo a me ensinar e pela companhia maravilhosa nestes anos: Alex Amaral, Glaucio Valdameri, Fernanda Barbosa, Paulo Worfel, Caroline Valente, Gisele Arruda, Anna Brandt, Carina Scoparo, Amanda Pires, Lyvia Petiz, Monique Meyenberg, Camila Tamielo, Juliana Kenski, Thiago Jacomasso, Patrícia Peres, João Bento, Marília Locatelli e em especial, Juliana Amorim (minha "irmã científica") e Andréia Suzukawa e Elizabeth Cunha pela paciência em responder minhas infinitas dúvidas e por me ajudarem tanto, em todos os momentos;

À minha turma de mestrado, pela companhia, pelas risadas e pelo ombro amigo, sempre;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências-Bioquímica, pela oportunidade;

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro;

E por fim, mas não menos importante, à todos os meus mestres que contribuíram para que eu chegasse até aqui, em especial duas pessoas que possuem um papel essencial no meu aprendizado na pesquisa: Prof<sup>a</sup> Anita Nishiyama, que confiou em mim quando ainda estava no início da faculdade e me aceitou como aluna no laboratório da Fisiologia me mostrando os primeiros passos na pesquisa e me

oferendo muita aprendizagem e a minha querida professora e amiga Dr<sup>a</sup> Regina Maria Vilela, que eu tenho total admiração, obrigada pelo seu incentivo, força e por ser um exemplo para mim.

À todos vocês, muito obrigada!!!!

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende"

Leonardo da Vinci

"Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei"

Almir Sater

"A mente que se abre a novas idéias jamais retorna ao seu tamanho original"

Albert Einstein

## RESUMO

Importantes efeitos biológicos têm sido descritos para polissacarídeos isolados de diversas fontes, entre estes a ação antitumoral. A atividade biológica de polissacarídeos nativos pode ser potencializada através da sua complexação com metais, como o vanádio. O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos de uma xiloglucana extraída de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e seu complexo com oxovanádio (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) em células de melanoma murino B16F10. Para este fim, foram avaliados a viabilidade e proliferação celular, a indução de morte, a morfologia celular e alguns parâmetros do metabolismo oxidativo destas células. A viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT, foi reduzida após o tratamento com XGC (5 a 300 µg/mL), atingindo uma redução máxima de cerca de 50% após o tratamento com a concentração de 25 µg/mL, independente do tempo de tratamento (24/48 e 72 horas). Da mesma forma, XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> reduziu a viabilidade nas concentrações avaliadas (2,5 a 300 µg/mL), sendo na menor concentração de 2,5 µg/mL uma redução de 23%. Semelhantemente, a proliferação celular avaliada pela exclusão do Azul de Trypan foi reduzida em cerca de 46% quando as células foram tratadas com XGC 25 µg/mL por 24 horas e em 52% quando tratadas com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 25 µg/mL, no mesmo período de tempo. No entanto, não foram observadas alterações na progressão do ciclo celular. Ainda, o tratamento com XGC não foi capaz de induzir morte nas células B16F10, ao contrário do tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> na concentração de 200 µg/mL, pelo período de 24 horas. No entanto, esta indução de morte não foi associada à liberação de citocromo c. XGC provocou um aumento na velocidade de consumo de oxigênio pelas células, especialmente na concentração de 10 µg/mL, sendo este aumento de ~64% no estado *leak* e 132% no estado desacoplado. Além disso, provocou um aumento na produção de lactato, sendo 14% e 17% para as concentrações de 10 e 25 µg/mL, respectivamente. Ao contrário, XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> reduziu em cerca de 50% o consumo de oxigênio e diminuiu significativamente a produção de piruvato, em 34% e ~22% para as concentrações de 5 e 25 µg/mL, respectivamente, sem aumentar a produção de lactato, indicando que ambos tratamentos interferem no metabolismo de células B16F10. Não foi observado alteração na razão ADP/ATP quando as células foram tratadas com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, bem como na atividade da enzima hexoquinase. Embora não significativo, observou-se uma tendência em diminuir a expressão da piruvato quinase M2, especialmente após o tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>. Ainda, o complexo na concentração de 200 µg/mL foi capaz de modular negativamente a expressão da subunidade β da ATP sintase. Os resultados demonstram que tanto XGC quanto XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> apresentam importante efeito antitumoral e sugerem que a adição do metal potencializa este efeito.



## ABSTRACT

Important biological effects have been reported for polysaccharides isolated from various sources, among them the antitumoral action. The biological activity of native polysaccharides can be enhanced through its complexation with metals, such vanadium. The aim of this study was to determine the effects of a xiloglucana extracted from *Copaifera langsdorffii* (XGC) and its complex with oxovanadium (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) in cells of murine melanoma B16F10. For this, we assessed cell proliferation and viability, induction of death, cell morphology and some parameters of the oxidative metabolism of these cells. Cell viability, evaluated by the MTT method, was reduced after treatment with XGC (5 to 300 µg/mL), reaching a maximum reduction of about 50% after treatment with concentration of 25 µg/mL, independent of treatment time (24/48 and 72 hours). Likewise, XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> (2.5 - 300 µg/mL) reduced the cell viability, in which lower concentration of 2.5 µg/mL the reduction was 23%. Similarly, cell proliferation assessed by exclusion of trypan blue was reduced about 46% when cells were treated with XGC 25 µg/mL for 24 hours and 52% when treated with XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 25 µg/mL. However, no changes were observed in cell cycle progression. Further, treatment with XGC was not able to induce cell death in B16F10 cells, unlike treatment with XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> at a concentration of 200 µg/mL at 24 hours. However, this induction of death was not associated with release of *cytochrome c*. XGC caused an increase in the rate of oxygen consumption by cells, especially at a concentration of 10 µg/mL, and this increase of ~ 64% in the state *leak* and 132% in the unbound state of respiration. Furthermore, caused increase in lactate levels, 14% and 17% for concentrations of 10 and 25 µg/mL, respectively. Unlike, XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> reduced about 50% oxygen consumption and significantly reduced the production of pyruvate, 34% and ~ 22% for concentrations of 5 and 25 µg/mL, respectively, without increasing the lactate production, indicating that both treatments interfere with the metabolism of B16F10 cells. No change was observed in the ADP / ATP when cells were treated with XGC and XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> as well the activity of the enzyme hexokinase. Although not significant, there was a tendency to decrease the expression of pyruvate kinase M2, especially after treatment with XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>. Further, XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> at a concentration of 200 µg/mL was able to negatively modulate the expression of the β subunit of ATP synthase. The results demonstrate that both XGC and XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> exhibit significant antitumor effect and suggest that the addition of metal enhances this effect.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ALTERAÇÕES METABÓLICAS QUE LEVAM AO EFEITO WARBURG NAS CÉLULAS TUMORAIS.....	23
FIGURA 2: FASES DA PROGRESSÃO TUMORAL DO MELANOMA.....	28
FIGURA 3: MECANISMOS DE AÇÃO PELO QUAL O VANÁDIO EXERCE SEU EFEITO ANTITUMORAL.....	39
FIGURA 4: FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	41
FIGURA 5: EFEITO DE XGC e XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	59
FIGURA 6: CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC.....	63
FIGURA 7: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM XGC.....	66
FIGURA 8: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM XGC.....	67
FIGURA 9: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup> .....	68
FIGURA 10: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup> .....	69
FIGURA 11: EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16F10.....	71
FIGURA 12: EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup> SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16F10.....	72
FIGURA 13: DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DA AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR.....	
FIGURA 14: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 VIAVÉIS E APOPTÓTICAS APÓS TRATAMENTO COM XGC.....	
FIGURA 15: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 VIAVÉIS E APOPTÓTICAS APÓS TRATAMENTO COM XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup> .....	77

FIGURA 16: EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO $XGC:VO^{2+/3+}$ SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS B16F10.....	80
FIGURA 17: TRAÇADO REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.....	82
FIGURA 18: EFEITO DE XGC SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.....	84
FIGURA 19: EFEITO DE $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.....	86
FIGURA 20: EFEITOS DE XGC SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS B16F10.....	88
FIGURA 21: EFEITOS DE $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS B16F10.....	89
FIGURA 22: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE ADP E ATP POR HPLC.....	90
FIGURA 23: AVALIAÇÃO DA RAZÃO ADP/ATP DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC E $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ .....	91
FIGURA 24: EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC E $XGC:VO^{2+/3+}$ SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HEXOQUINASE.....	93
FIGURA 25: GEL DE RNA EXTRAÍDO DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC E $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ .....	94
FIGURA 26: EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA PIRUVATO QUINASE M2 APÓS TRATAMENTO COM XGC E $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ .....	95
FIGURA 27: EXPRESSÃO GÊNICA DA SUBUNIDADE BETA DA ATP SINTASE APÓS TRATAMENTO COM XGC E $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$ .....	97

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	- American Cancer Society
ADP	- Adenosina difosfato
ATP	- Adenosina trifosfato
cDNA	- DNA complementar
DMSO	- Dimetilsufóxido
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FCCP	- Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
HBSS	- Solução salina balanceada de Hanks
hGAPDH	- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
hHPRT	- hipoxantina fosforibosiltransferase
HKII	- Hexoquinase isoforma II
IL-2	- Interleucina 2
IL-6	- Interleucina 6
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
MES	- Melanoma expansivo superficial
MLA	- Melanoma lentiginoso acral
MLM	- Melanoma lentigo maligno
MN	- Melanoma nodular
MRB	- Modificadores de resposta biológica
mRNA	- RNA mensageiro
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NO•	- Óxido nítrico
PBS	- Solução salina tamponada
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PI	- Iodeto de propídeo
PKM2	- Piruvato quinase isoforma 2
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	- Ácido ribonucléico
RT-qPCR	- PCR em tempo real

TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
VDAC	- Canal de ânion voltagem dependente
XGC	- Xiloglucana de <i>Copaifera langsdorffii</i>
XGC:VO <sup>2+</sup> /VO <sup>3+</sup>	- Xiloglucana de <i>Copaifera langsdorffii</i> complexada com oxovanádio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 CÂNCER.....	20
2.1.1 Aspectos gerais do metabolismo das células tumorais.....	22
2.2 MELANOMA.....	26
2.3 POLISSACARÍDEOS E SUA AÇÃO ANTITUMORAL.....	30
2.3.1 Ação de polissacarídeos em melanoma.....	32
2.4 XILOGLUCANAS DE RESERVA.....	34
2.5 VANÁDIO E SUAS AÇÕES BIOLÓGICAS.....	36
<b>3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>41</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	42
4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES, MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS UTILIZADOS.....	42
4.2.1 Preparo das soluções de xiloglucana e de seu complexo com oxovanádio.....	42
4.2.2 . Meio de cultura para as células B16F10.....	43
4.2.3 Solução de Tripsina-EDTA.....	44
4.2.4 Solução salina fosfato tamponada (PBS).....	44
4.2.5 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS).....	44
4.2.6 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI).....	45
4.2.7 Solução de iodeto de propídeo não desnaturante.....	45
4.2.8 Tampão de ligação Anexina V- FITC.....	45
4.2.9 Esterilização dos materiais utilizados.....	45
4.3 CULTIVO CELULAR.....	46
4.3.1 Linhagem Celular.....	46

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	46
4.4.1 Viabilidade celular.....	46
4.4.2 Curva de proliferação.....	47
4.4.3 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.....	48
4.4.4 Morfologia celular.....	48
4.4.4.1 Microscopia óptica.....	48
4.4.5 Avaliação da morte celular.....	49
4.4.5.1 Ensaio de liberação de citocromo c.....	49
4.4.5.2 Marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo.....	50
4.4.6 Análise do metabolismo da célula tumoral.....	51
4.4.6.1 Consumo de oxigênio.....	51
4.4.6.2 Produção de lactato e piruvato.....	52
4.4.6.3 Determinação da razão ADP/ATP.....	52
4.4.6.4 Atividade da hexoquinase.....	53
4.4.7 Avaliação da expressão da Piruvato quinase e ATP sintase.....	54
4.4.7.1 Extração e purificação do RNA celular.....	54
4.4.7.2 Síntese de cDNA.....	55
4.4.7.3 Avaliação da expressão gênica.....	55
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	58
5.2 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16F10.....	61
5.3 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE O CICLO CELULAR.....	65
5.4 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR.....	70
5.5 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO SOBRE A INDUÇÃO DE MORTE CELULAR.....	73
5.5.1 Marcação com Anexina V-FITC/PI.....	73



5.5.2 Liberação de citocromo c.....	78
5.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO <sub>2</sub> <sup>+</sup> /3 <sup>+</sup> SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO DE CÉLULAS B16F10...	80
5.6.1 Avaliação do consumo de oxigênio.....	80
5.6.2 Avaliação da produção de lactato e piruvato.....	86
5.6.3 Avaliação da razão ADP/ATP.....	89
5.6.4 Avaliação da atividade da enzima hexoquinase.....	92
5.6.5 Análise da expressão gênica da enzima piruvato quinase.....	93
5.6.6 Análise da expressão gênica da subunidade $\beta$ da ATP sintase ( $\beta$ - F1-ATPase).....	95
<b>6. DISCUSSÃO FINAL.....</b>	<b>99</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que vêm crescendo significativamente nas últimas décadas. Alguns tipos de cânceres já são considerados um importante problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (GUERRA *et al.*, 2005).

O câncer surge como resultado de um crescimento desordenado das células (ALBERTSSON *et al.*, 2003), podendo espalhar-se para outros tecidos e órgãos, caracterizando a metástase (INCA, 2010). Entre os tipos de tumores com alto potencial metastático, encontra-se o melanoma maligno.

O melanoma maligno, ou melanoma metastático é um câncer de pele que se desenvolve da transformação maligna dos melanócitos, células pigmentares da pele (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007), representando uma das malignidades mais agressivas existentes em humanos, cuja incidência tem aumentado progressivamente desde a década de 60 (LAHN; SUNDELL, 2004; LEVERKUS; GOLLNICK, 2006). A Organização Mundial da Saúde estima que anualmente ocorram cerca de 130 mil casos novos desse câncer no mundo inteiro. No Brasil, a estimativa para o ano de 2012 é de 6.220 novos casos, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012).

Este câncer é geralmente muito resistente aos tratamentos utilizados, sendo, portanto, de difícil cura e, conseqüentemente, alta mortalidade (ANDERSON *et al.*, 1995; SERRONE; HERSEY 1999; PRIGNANO *et al.*, 2002; SOENGAS; LOWE, 2003; PERLIS; HERLYN, 2004; CHIN *et al.*, 2006). Neste sentido, a busca por novos compostos com ação antitumoral tem crescido substancialmente.

Polissacarídeos isolados a partir de diferentes fontes têm sido estudados quanto às suas aplicações biológicas, entre elas, a atividade antitumoral e imunomoduladora (CAO; IKEDA, 2009). Os produtos de origem vegetal possuem um histórico de grande sucesso como princípios ativos biológicos para agentes terapêuticos, sendo ferramentas úteis para desenvolver drogas contra uma série de doenças, entre elas o câncer (CLARDY; WALSH, 2004).

A maioria dos polissacarídeos derivados de plantas é considerado relativamente não tóxico, por não causarem efeitos colaterais aparentemente detectáveis, problemas estes associados com compostos sintéticos. Assim, polissacarídeos vegetais são candidatos ideais à terapêutica como agentes com potenciais atividades biológicas (SCHEPETKIN; QUIMN, 2006).

Entre as atividades biológicas dos polissacarídeos relatadas na literatura encontram-se a atividade anti-viral (NISHINO *et al.*, 1994; OKADA; MINAMISHINA, 1987), anti-bacteriana (RUIZ-BRAVO *et al.*, 2001; LI W *et al.*, 2004), anti-fúngica (EL-HASAN *et al.*, 2009), anti-parasitária (YUN *et al.*, 1997), anti-coagulante (MENDES *et al.*, 2009) e antitumoral (HASHIMOTO *et al.*, 1983; OGAWA *et al.*, 1989; MULLHER;ANDERER, 1990; PENG *et al.*, 1991; NISHINO *et al.*, 1994;SEFEHRI *et al.*, 1998; HAYASHI *et al.*, 2000; OKA *et al.*, 2002; YALIN *et al.*, 2005).

Estudos com xiloglucanas demonstraram que elas são capazes de estimular a resposta de macrófagos (PAULY *et al.*, 1999; ROSÁRIO *et al.*, 2008; 2011), além de exercerem efeito antitumoral contra células de adenocarcinoma de cólon, COLO 201 (KATO *et al.*, 2001) e células de hepatocarcinoma HepG2 (CAO, IKEDA, 2009). Além dos carboidratos exercerem seus efeitos biológicos na sua forma nativa, carboidratos quimicamente modificados vêm sendo estudados. Entre eles, os complexos de carboidratos com o vanádio, um elemento traço amplamente distribuído na natureza. Diversos efeitos biológicos são atribuídos à este elemento, entre eles a ação mimética à insulina, antihiperlipidêmica, antihipertensiva, diurético, imunomodulador e antitumoral (EVANGELOUS *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; ABDELHAMID *et al.*, 2010, BARRIO, 2010). Na forma complexada, acredita-se que os carboidratos atuem como carreadores do metal, e têm sido estudados como potenciais agentes antitumorais (YU *et al.*, 2011).

Dessa forma, levando em consideração que o melanoma metastático é altamente resistente aos tratamentos atuais sendo necessário o estudo de novos agentes terapêuticos e, que neste sentido, polissacarídeos nativos e seus complexos com vanádio apresentam potencial terapêutico, o presente estudo visa avaliar o efeito de xiloglucanas extraídas das sementes de *Copaifera langsdorffii* e seu complexo com oxovanádio (IV/V) sobre células de melanoma murino *in vitro*, buscando contribuir para um maior conhecimento sobre a ação antitumoral de polissacarídeos e seus mecanismos de ação, além de propor uma possibilidade terapêutica adjuvante ao tratamento do câncer.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a ausência de estudos sobre os efeitos desta xiloglucana e de seu complexo com oxovanádio em células de melanoma murino (B16F10), a facilidade de obtenção do polissacarídeo e, que uma possível ação antitumoral de polissacarídeos modificadores da resposta biológica (MRB) tem sido avaliada em diferentes tipos de células tumorais, este estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e de seu complexo com oxovanádio (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) em células de melanoma murino B16F10 *in vitro*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> em células B16F10;
- Avaliar os efeitos do polissacarídeo e seu complexo sobre a proliferação das células B16F10;
- Avaliar a indução de morte celular mediada por XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> por meio da liberação de citocromo c e marcação com anexina/PI;
- Avaliar mudanças morfológicas induzidas pelo polissacarídeo e seu complexo em estudo por meio de microscopia de luz;
- Avaliar a interferência no metabolismo oxidativo das células B16F10 pelos compostos em estudo. Para tal se propõe:
  - a) Analisar o consumo de oxigênio;
  - b) Analisar a produção de lactato e piruvato;
  - c) Analisar a razão ADP/ATP;
  - d) Analisar a atividade da enzima hexoquinase;
  - e) Analisar a modulação da expressão da enzima Piruvato quinase e ATP sintase por meio de RT-qPCR.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

Câncer é a classificação patológica para um conjunto de doenças causadas por alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular, culminando em aumento desordenado e incontrolado da divisão celular. Os estudos dos mecanismos moleculares que levam ao câncer mostram que estas doenças são decorrentes de várias mutações somáticas acumuladas numa única célula tendo como resultado falhas nos processos que induzem a divisão celular e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada, denominada apoptose (ALBERTSSON *et al.*, 2003). Essas mutações afetam duas grandes classes de genes que são: genes de proliferação, conhecidos como proto-oncogenes, os quais codificam proteínas que auxiliam na divisão celular e genes anti-oncogenes, considerados supressores tumorais (ALBERTS *et al.*, 2002).

Os tumores apresentam heterogeneidade celular, como fibroblastos, células epiteliais, células do sistema imunitário, células mesenquimatosas, assim como células formadoras de vasos sanguíneos e linfáticos (CHE *et al.*, 2006; KELLY, 2008). Além disso, as células tumorais apresentam alguns aspectos que as diferenciam das células normais, tais como:

- 1) Elas não dependem de fatores de crescimento como as células normais, visto que são capazes de secretar seus próprios fatores de crescimento para estimular a proliferação;
- 2) Células normais requerem contato com superfície do meio extracelular para poderem crescer, enquanto que células tumorais são independentes de ancoragem;
- 3) Em cultura, células normais possuem inibição por contato formando uma monocamada, enquanto que as tumorais, frequentemente crescem umas sobre as outras;
- 4) Células normais param de proliferar quando atingem certa densidade, enquanto que as tumorais continuam a se proliferar (MACDONALD; FORD, 2000).

As neoplasias podem ser classificadas em malignas ou benignas. Os tumores malignos são caracterizados por suas células apresentarem um alto consumo de glucose, ocorrendo competição entre esse tipo celular e as normais pelo substrato nutricional circulante e pelos estoques do organismo; e liberarem ácido láctico, além de apresentarem alto gasto energético devido ao aumento na síntese protéica e de DNA; terem capacidade de invadir tecidos e órgãos provocando metástases e serem capazes de aumentar a síntese *de novo* de ácidos graxos. Já os tumores benignos são bem diferenciados, conservam mais suas funções celulares, possuem um crescimento lento, crescendo de forma compacta permanecendo no seu local de origem sem provocar metástases (OKADA; MAK, 2004; VERMEULEN *et al.*, 2008).

Quanto à sua origem, os tumores podem ser divididos em carcinomas, que são tumores sólidos derivados do tecido epitelial, representando a maioria dos tumores malignos já descritos; os sarcomas, que são cânceres derivados dos tecidos conjuntivo e musculares; os cânceres de sistema nervoso e as leucemias (FERREIRA; ROCHA, 2004).

A quimioterapia agressiva tem sido a base para a terapia do câncer e uma pesquisa extensiva está voltada para o desenvolvimento de agentes anti-neoplásicos mais específicos, menos tóxicos e em terapias baseadas em mecanismos que envolvam vias moleculares críticas dos tumores (GREEN, 2005). A maioria dos quimioterápicos atuam inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, sendo que a seletividade entre células normais e as tumorais é baixa e os efeitos colaterais são elevados. Além disso, a toxicidade dessas drogas limitam seu uso, uma vez que muitos cânceres humanos apresentam-se quimioresistentes e ainda, podem causar danos no DNA de células normais, induzindo a formação de uma segunda neoplasia (GARRETT; WORKMAN, 1999). Dentre os cânceres que são quimioresistentes encontra-se o melanoma, representando um significativo e crescente problema de saúde pública mundial

As limitações da quimioterapia tradicional para o tratamento da doença motivam a busca de compostos alternativos com propriedades diferenciadas. Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao câncer possibilita o uso de terapias empregando-se estratégias adjuvantes, capazes de modular a resposta imune contra o tumor. Assim, compostos de origem natural são considerados de importância estratégica na pesquisa de novas substâncias seguras

e eficazes, para uso isolado ou como adjuvantes no tratamento do câncer (TANAKA *et al.*, 2005; CAO *et al.*, 2010).

### 2.1.1 Aspectos gerais do metabolismo das células tumorais

As células tumorais apresentam metabolismo muito distinto das células saudáveis. Considerando que as neoplasias malignas mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão celular, importantes alterações no metabolismo energético dessas células ocorrem para que elas possam atingir alta taxa de proliferação. Para alguns tumores, uma correlação entre a capacidade invasiva e a sua taxa glicolítica foi observada (DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009). Além disso, essas alterações no metabolismo permitem que as células tumorais apresentem resistência a certos sinais de morte celular (TENNANT *et al.*, 2010).

A alteração mais conhecida e melhor compreendida do metabolismo energético da célula tumoral é o aumento da taxa da glicólise para gerar energia necessária para os processos celulares (ZHOU *et al.*, 2010). Em condições normais, a glicólise é inibida na presença de oxigênio, permitindo que as mitocôndrias oxidem piruvato a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (PLATHOW; WEBER, 2008). No início da década de 20, Otto Warburg observou que a célula tumoral apresentava dominância da glicólise em relação a fosforilação oxidativa, convertendo glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio, o que ficou conhecido como "efeito Warburg" (WOLF *et al.*, 2011). Desde então, as causas deste efeito tem sido constantemente debatidas e ainda não são totalmente compreendidas (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008; STUBBS; GRIFFITHS, 2010). Além disso, Warburg também observou que o tecido tumoral apresentava um consumo de glucose superior aos tecidos normais (FERREIRA, 2010), conferindo vantagens adaptativas diante do ambiente ácido e em condições de hipóxia (RESENDES-ANTONIO *et al.*, 2010).

Essa elevada produção de lactato nas células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, é conhecida como "glicólise aeróbica" e é uma adaptação da célula tumoral, que permite que ela se prolifere rapidamente (PLATHOW; WEBER, 2008) e tenha uma alta taxa de invasão. Além disso, o acúmulo de ácido láctico produzido por células tumorais pode perturbar os mecanismos anti-tumorais do hospedeiro.



Recentemente, descobriu-se que alta taxa de ácido láctico pode suprimir a proliferação de linfócitos T citotóxicos humanos, além de diminuir sua atividade citotóxica. Esses efeitos podem contribuir para que as células neoplásicas escapem da ação do sistema imunológico (ZHOU *et al.*, 2010).

Desde as observações de Warburg, várias pesquisas têm apoiado a idéia de que as alterações metabólicas na célula tumoral possuem papel significativo na transformação, proliferação, angiogênese e metástase do câncer (RESENDES-ANTONIO *et al.*, 2010). Acredita-se que a expressão aumentada das enzimas glicolíticas e transportadores de glicose, juntamente com uma *dowregulation* do metabolismo mitocondrial, poderia ser a base do efeito Warburg nas células tumorais, como demonstrado na figura 1 a seguir (DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009).

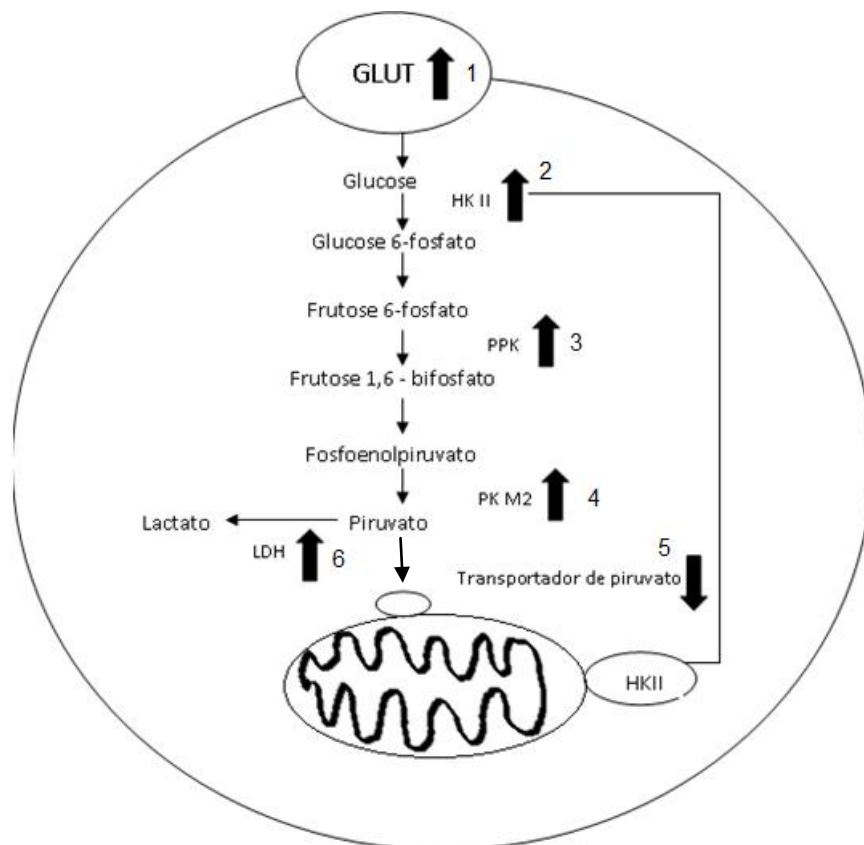


FIGURA 1: ALTERAÇÕES METABÓLICAS QUE LEVAM AO EFEITO WARBURG NAS CÉLULAS TUMORAIS.

FONTE: adaptado de DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009

NOTA: Setas para cima indicam aumento da expressão e setas para baixo indicam diminuição da expressão. 1) aumento na expressão de transportadores de glicose, 2) altos níveis da isoforma II da hexoquinase que transloca-se para a membrana mitocondrial externa, 3) predominância da isoforma L da fosfofrutoquinase, 4) Aumento na expressão da piruvato quinase do tipo M2, 5) diminuição da entrada de piruvato para a matriz mitocondrial e 6) aumento nos níveis de expressão da lactato desidrogenase. GLUT: transportadores de glicose; HKII: hexoquinase isoforma II; PPK: fosfofrutoquinase; PKM2: piruvato quinase isoforma M2 e LDH: lactato desidrogenase.

As primeiras sugestões dessas alterações foram propostas por Bustamante e colaboradores (1977), que acreditavam que a distribuição subcelular da hexoquinase, uma das enzimas chaves da via glicolítica, poderia ser a principal causa do aumento da glicólise em tumores (citado por RISTOW, 2006). Nas células tumorais ocorre aumento da expressão desta enzima, especialmente a isoforma II (BAYLEY; DEVILLE, 2012). Ao contrário das células normais, em que a hexoquinase encontra-se no citosol, a célula tumoral possui a hexoquinase localizada, principalmente, na membrana mitocondrial externa, ancorada ao canal de ânion voltagem dependente (VDAC). Alguns estudos sugerem que esta localização da hexoquinase exerce um papel importante de resistência à apoptose, impedindo a interação de proteínas pró-apoptóticas à VDAC, e consequentemente, impedindo a liberação de citocromo *c* e outros fatores apoptóticos da mitocôndria (PEDERSEN, 2007; BHARDWAJ, 2010; WENNER, 2011; WOLF, 2011). Devido ao seu importante papel na glicólise e da resistência à apoptose, a hexoquinase é um dos principais alvos metabólicos de estudo para a inibição da via glicolítica no tratamento do câncer. Alguns inibidores sintéticos desta enzima, como 2-desoxiglicose, Ionidamina e 3-bromopiruvato, já se encontram em estudos pré-clínicos (ZHAO, 2011; WOLF, 2011; GONG, 2011).

As peculiaridades do metabolismo da célula tumoral também estão relacionadas à mutações em genes supressores de tumor e oncogenes que regulam o metabolismo celular. Mutações gênicas incluindo p53, c-Myc e m-TOR podem, diretamente ou através de vias de sinalização, afetar as vias metabólicas das células tumorais. Foi demonstrado que o oncogene c-Myc aumenta a produção de lactato e a atividade da lactato desidrogenase e que o oncogene Akt também induz a glicólise em cultura de células (SOLAINI *et al.*, 2010).

As células tumorais que abrigam estas mutações também são capazes de sobreviver em ambientes adversos, como em situações de hipóxia. Em resposta à hipóxia, ocorre a ativação do HIF-1 $\alpha$  (fator induzido por hipóxia), um fator de transcrição que regula centenas de genes envolvidos no metabolismo tumoral e sua progressão. Quando ativado, o HIF-1 $\alpha$  aumenta a expressão de enzimas glicolíticas, como hexoquinase, fosfofrutoquinase, aldolase, fosfoglicerato quinase, enolase, piruvato quinase e lactato desidrogenase e, ao mesmo tempo diminui a respiração mitocondrial. Além disso, o HIF-1 $\alpha$  induz a expressão de genes que codificam para transportadores de glicose (GLUTs) e, dessa maneira, aumenta a captação de

glicose pela célula tumoral (SHAW, 2006; MORENO-SANCHES *et al.*, 2007; PAN; MAK, 2007; STUBBS; GRIFFIHS, 2010; KAEIN; THOMPSON, 2010; SOLAINI *et al.*, 2010; WELJIE, 2010).

Outro achado importante no metabolismo da célula tumoral, no que diz respeito ao metabolismo dos carboidratos, é o chamado "Efeito Crabtree" (inibição da respiração pela glicose), que se caracteriza por uma atividade respiratória diminuída durante a utilização da glicose. O mecanismo molecular proposto para este comportamento envolve a presença de uma isoenzima da piruvato quinase que, nas células tumorais é do tipo M2, a qual é estimulada por frutose-1,6-bifosfato e inibida por L-aminoácidos (LU, 2012). Esta isoforma, que está superexpressa nas células tumorais e possui papel importante na reprogramação metabólica, é outro importante alvo terapêutico no tratamento do câncer (BAYLEY; DEVILEE, 2012). Tanto o efeito Warburg quanto o Crabtree são parte do mecanismo que direciona para o fluxo metabólico fermentativo nos tumores (DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009).

Em adição ao aumento da atividade glicolítica, algumas alterações no metabolismo lipídico também são encontradas nas células tumorais, incluindo a superexpressão de ácido graxo sintase que cataliza a síntese *de novo* de ácidos graxos. Em contraste, as células tumorais não armazenam quantidades significativas de triglicerídeos (PLATHOW; WEBER, 2008). A lipogênese desempenha papel importante na tumorigênese e proliferação celular. Primeiro, uma grande proporção de ácidos graxos é sintetizada *de novo* nas membranas celulares, ao invés de ser eliminada. Essa reciclagem da síntese de ácidos graxos nas membranas celulares permitem a formação de membranas recém sintetizadas para que a célula se adapte à alta taxa de proliferação e divisão celular (RESENDES-ANTONIO *et al.*, 2010).

Algumas características do metabolismo da célula tumoral são utilizadas como marcadores de diagnóstico em câncer e também como alvos terapêutico. A idéia de inibir o metabolismo da célula tumoral como potencial tratamento é conhecida como "terapia metabólica". Estudos têm mostrado que a inibição da glicólise e/ou fosforilação oxidativa resulta em retardo de crescimento ou diminuição na viabilidade de células tumorais *in vitro* (PENSO; BEITNER, 1998; DIAZ-RUIZ *et al.*, 2009; PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2009).

A investigação a cerca do metabolismo da célula tumoral é um campo de pesquisa que vem crescendo nos últimos anos. Uma compreensão dos mecanismos que levam a esta reprogramação metabólica podem ajudar no desenvolvimento de

medicamentos mais eficazes que são capazes de atuar em alvos específicos envolvidos no metabolismo da célula tumoral (ZHOU *et al.*, 2010; ZHAO, 2011).

## 2.2 MELANOMA

O melanoma cutâneo, ou melanoma metastático, é um tipo de câncer de pele que se desenvolve da transformação maligna dos melanócitos, células derivadas da crista neural, produtoras de pigmento que residem na camada basal da epiderme na pele humana, também encontrada nos olhos e intestino. Este tipo de câncer apresenta uma elevada agressividade biológica, podendo originar-se a partir de uma lesão pigmentada benigna ou da pele normal. Sucessivamente, pode invadir a derme, disseminar-se aos linfonodos regionais e apresentar metástases à distância, especialmente em pulmão, linfonodos e cérebro (RIGEL; CARUCCI, 2000; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007; INCA, 2010).

O mecanismo molecular exato que leva à desregulação da homeostase que envolve os melanócitos é ainda pouco conhecido (HASS, 2005). Menos se sabe sobre anormalidades genéticas em melanomas em relação a outros cânceres como leucemias, linfomas, gliomas e vários carcinomas (MEIER *et al.*, 1998). Porém, a transformação de melanócitos em melanomas ocorre por causa de mutações gênicas em aproximadamente 25 a 40% dos casos (GHIORZO; SCARRA, 2003).

Consideram-se quatro tipos de melanoma: melanoma expansivo superficial (MES), o mais freqüente, correspondendo a 70% dos casos; melanoma nodular (MN) que representa 15 a 30% dos casos; melanoma lentiginoso acral (MLA) que acomete principalmente pessoas de pele negra e melanoma lentigo maligno (MLM), que representa 5% dos casos. O melanoma apresenta duas fases distintas: a de crescimento horizontal ou radial, em que apenas está envolvida a epiderme, e de crescimento vertical, em que há invasão da derme possibilitando a ocorrência de disseminação e formação de metástases (ALONSO *et al.*, 2004).

A metástase ocorre quando a célula que sofreu mutação deixa de expressar marcadores de adesão célula-célula e célula-matriz, como as E-caderina e  $\beta$ -catenina, que a mantém aderida no tecido epitelial. A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana que ancora as células epiteliais em junções aderentes, a qual se liga

ao citoesqueleto de actina, por intermédio da  $\beta$ -catenina. Desta maneira, em seu estado normal, os melanócitos encontram-se ligados a queratinócitos. Após a transformação maligna, células de melanoma diminuem a expressão ou deixam de expressar E-caderina, o que resulta na deficiência de ancoramento epidérmico e da regulação por queratinócitos. A baixa expressão desta molécula implica que a  $\beta$ -catenina, por sua vez, encontra-se na forma solúvel no citosol. Isto resulta na estimulação das proteínas envolvidas com a indução do ciclo celular, ocasionando proliferação desenfreada da célula transformada. A proliferação desordenada gera a difusão destas células pelo tecido e pela falta de aderência e, junto com sua capacidade invasiva, pode penetrar em um vaso sanguíneo e ser levada para outros órgãos, podendo então estabelecer novas colônias (TUCCI *et al.*, 2007). A capacidade invasiva e migratória depende da expressão de metaloproteases que agem clivando proteínas da matriz extracelular, resultando na capacidade metastática (CURRAN; MURRAY, 1999).

A classificação da progressão do melanoma é realizada de acordo com seu grau de crescimento horizontal ou de invasão dérmica, seguindo o modelo proposto por Clark, em cinco níveis, como pode ser visualizado na figura 2 (MILLER ; MIHM, 2006).

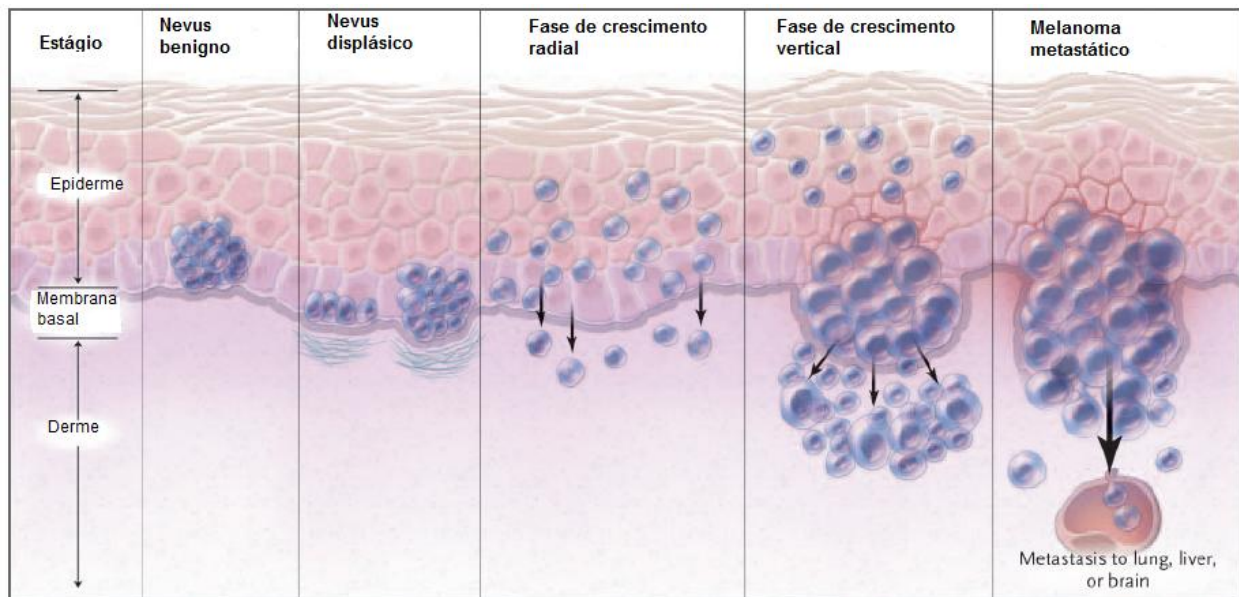


FIGURA 2: FASES DA PROGRESSÃO TUMORAL DO MELANOMA.

FONTE: MILLER e MIHM (2006)

NOTA: Os estágios da progressão do melanoma são divididos conforme suas características histológicas. No nevus benigno ocorre uma hiperplasia dos melanócitos. Quando este nevus perde sua homeostase ele evolui para o nevus displásico. Na fase de crescimento radial os nevus são capazes de ultrapassar a membrana basal, no entanto a proliferação celular permanece na região da derme. Na fase de crescimento vertical, ocorre proliferação na derme e por fim, quando as células invadem vasos sanguíneos e linfáticos, dando origem à tumores em tecidos distantes, caracteriza-se como a fase de metástase do melanoma.

Este câncer representa uma das malignidades mais agressivas existentes em humanos, cuja incidência tem aumentado progressivamente desde a década de 60 (MEIER, 1998; BALDI *et al.*, 2003; LAHN; SUNDELL, 2004; LEVERKUS; GOLLNICK, 2006). Nos Estados Unidos, sua incidência aumentou quinze vezes nos últimos 40 anos, o que representa o maior aumento de incidência entre as neoplasias. Dentre os cânceres de pele, o melanoma é o menos frequente, porém sua letalidade é a mais elevada. A Organização Mundial da Saúde estima que anualmente ocorram cerca de 130 mil casos novos desse câncer no mundo inteiro. No Brasil, a estimativa para o ano de 2012 é de 6.220 novos casos, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012).

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estágios iniciais. A média de sobrevivência dos pacientes fica entre 6 e 9 meses nos estágios metastáticos (ANDERSON *et al.*, 1995; SERRONE; HERSEY, 1999;

PRIGNANO *et al.*, 2002; CHIN *et al.*, 2006). Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56% (INCA, 2010). Apesar de ser o tipo mais raro de câncer de pele, o melanoma apresenta elevada mortalidade devido ao seu alto poder metastático (ACS, 2009). Segundo o INCA (2010), o número de óbitos no ano de 2008 em pacientes portadores deste tumor foi de 1.303, sendo 749 homens e 554 mulheres. De acordo com estatísticas de 1973 a 1997, o aumento da mortalidade por melanoma em indivíduos com 65 anos ou mais, especialmente homens, foi o segundo entre todos os tipos de câncer.

Os fatores de risco, assim como para outros tipos de cânceres, incluem a predisposição genética e a exposição a fatores ambientais, sendo que a maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva ao sol. No entanto, o papel específico da radiação solar na gênese desse tumor ainda não está plenamente elucidado (GANDINI *et al.*, 2005b). Outros fatores de risco para todos os tipos de câncer de pele incluem sensibilidade da pele ao sol, história de exposição solar excessiva, história de queimadura solar severa prévia, doenças imunossupressoras e indivíduos de cabelo claro e pele clara (MARKS, 2000; LAHN; SUNDELL, 2004; GANDINI *et al.*, 2005a; ACS, 2009; INCA, 2010).

O melanoma metastático é geralmente muito resistente aos tratamentos quimioterápicos utilizados, sendo, portanto, de difícil cura (ANDERSON *et al.*, 1995; SERRONE; HERSEY, 1999; PRIGNANO *et al.*, 2002; SOENGAS; LOWE, 2003; PERLIS; HERLYN, 2004; CHIN *et al.*, 2006). A resistência ao tratamento pode ocorrer por algumas modificações no metabolismo da célula maligna, como por exemplo, redução da concentração intra-celular da droga ou defeitos na via de apoptose (SMALLEY; EISEN, 2003). Atualmente o quimioterápico de escolha para o tratamento do melanoma é a dacarbazina, um agente alquilante de DNA, entretanto apresenta sérios efeitos colaterais. Além da quimioterapia, a imunoterapia com IL-2 e IFN- $\alpha$  vem sendo usada nestes pacientes, no entanto, assim como a quimioterapia, também apresenta alta toxicidade (NIKOLAOU; FLAHERTY; TSAO, 2012).

As células de melanoma podem ser facilmente mantidas em cultura devido a sua alta capacidade proliferativa (LEAL *et al.*, 2003). Assim, elas constituem um excelente modelo para o estudo de ação de novos compostos contra as células tumorais. Muitos trabalhos têm descrito a utilização de compostos isolados de fontes



vegetais com o objetivo de promover uma resposta antitumoral *in vitro* e *in vivo* e assim descobrir novos agentes contra o câncer (JIN *et al.*, 2002). Entre os diversos compostos já estudados com esta finalidade, grande destaque tem sido dado para os polissacarídeos isolados de diferentes fontes (CHEN *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2012). Neste aspecto, uma revisão sobre as ações antitumorais dos polissacarídeos será apresentada a seguir.

### 2.3 POLISSACARÍDEOS E SUA AÇÃO ANTITUMORAL

Nas plantas, apesar das diferenças marcantes entre as estruturas químicas dos variados tipos de polissacarídeos constituintes, suas propriedades físico-químicas podem ser consideradas semelhantes (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). Assim, suas funções variam desde funções primárias dos polissacarídeos no vegetal, como a de reserva (BUCKERIDGE; DIETRICH, 1996) e a função estrutural (LIMA *et al.*, 2004), até funções secundárias, como proteção mecânica (LISBOA *et al.*, 2006) e controle do potencial osmótico das células (BIELESKI, 1993).

Por possuírem uma variedade de estruturas, cobrem uma vasta faixa de aplicações (RINAUDO, 2001), que vão desde aplicações na indústria como modificadores de textura, agentes geleificantes, espessantes e estabilizantes nas áreas cosméticas, alimentícias, farmacêuticas, biomédicas e têxteis (SUDHAKAR *et al.*, 1996; CLOSS *et al.*, 1999; NISHINARI *et al.*, 2000) até como agentes terapêuticos, atuando como modificadores da resposta biológica (BOHN; BeMILLER, 1995; SCHEPETKIN; QUINM, 2006).

Compostos capazes de alterar alguma função do organismo, como por exemplo, aumentar e/ou prolongar a resposta imunológica são classificados como moduladores da resposta biológica (MRBs) e/ou imunomoduladores, respectivamente (BOHN; BeMILLER, 1995). Os MRBs podem ser moléculas produzidas endogenamente, como por exemplo, citocinas e de fontes exógenas derivados de bactérias, algas e plantas (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006).

Um composto pode ser classificado como um MRB se atuar pelo menos por um dos seguintes mecanismos: **A.** Aumento direto da resposta anti-tumoral do hospedeiro, promovendo o aumento de número ou atividade das células efectoras, ou

da produção de mediadores solúveis, como as citocinas; **B.** Redução dos mecanismos supressores, promovendo, desta forma, o aumento indireto da resposta imune do hospedeiro ao tumor; **C.** Aumento das defesas do hospedeiro através de seu efeito como mediador natural ou sintético das respostas imunes; **D.** Modificação das características de membrana das células tumorais, de forma a aumentar sua imunogenicidade, alterar seus padrões de disseminação metastática, ou torná-las mais susceptíveis à destruição por mecanismos imunológicos ou por agentes citotóxicos (MITCHELL, 1988).

Em relação aos polissacarídeos, os estudos visando aplicações terapêuticas destas moléculas vêm crescendo nas últimas décadas, com destaque para certos polissacarídeos isolados de plantas, para os quais tem sido observada uma série de propriedades terapêuticas benéficas e, em especial baixa toxicidade (BOHN; BeMILLER, 1995; TZIANABOS, 2000). A maioria dos efeitos observados parece ser decorrente da modulação da resposta imunológica (SCHEPETKIN; QUINM, 2006), os quais dão a estas moléculas o papel de MRBs, mais especificamente imunomoduladores.

Os primeiros comunicados da atividade anti-tumoral de polissacarídeos relatam de 1943, a partir da bactéria *Serratia marcescens*, que ficou conhecida como polissacarídeo Shear's (OOI;LUI, 2000). Mais tarde, outro estudo envolvendo polissacarídeos como MRBs foi realizado por BRADNER *et al* no ano de 1958 (citado por BOHN; BeMILLER, 1995). Naquele trabalho, os autores demonstraram que polissacarídeos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* promoveram atividade antitumoral. Dentre a ampla variedade de estudos realizados com polissacarídeos de diferentes fontes naturais, especial destaque tem sido dado às glucanas, mananas, galactomananas e arabinogalactanas. As  $\beta$ - glucanas, isoladas principalmente de bactérias, fungos e plantas são os polissacarídeos mais estudados quanto às suas atividades imunológicas e antitumorais (BOHN;BeMILLER, 1995). Dentre as  $\beta$ - glucanas, a lentinana, derivada de cogumelos e a schizophyllan, derivada do *Schizophyllum commune*, têm sido empregadas em pacientes para imunoterapia tumoral, estimulando as células de defesa do hospedeiro e eliminando as células tumorais (YAN *et al.*, 1999). Outra classe que desperta interesse a respeito de suas atividades biológicas são as xiloglucanas. Xiloglucanas de tamarindo (*T. indica*), modificadas a diferentes graus de sulfatação, exibiram atividade antiviral contra o vírus da rubéola

(MASTROMARINO *et al.*, 1997) e aumento da capacidade fagocítica em macrófagos humanos (PAULY *et al.*, 1999). Xiloglucana de *Tropaeolum majus* apresentou atividade antimutagênica em estudo em que a mutagênese foi induzida pelo composto nitroaromático 1-nitropireno (HENSEL; MEIER, 1999). Em outro estudo, ROSÁRIO *et al* (2008; 2011) demonstraram que xiloglucanas extraídas de *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei* apresentaram atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos, além de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, células que estão diretamente relacionadas com a atividade antitumoral via imunomodulação.

A busca por polissacarídeos como agentes antitumorais decorre da insatisfação com a quimioterapia e radioterapia, rotineiramente empregadas no tratamento do câncer. Um grande número de compostos químicos identificados como sendo, a princípio agentes específicos para destruir as células cancerosas são também tóxico para as células normais. Muitos dos medicamentos antineoplásicos têm graves efeitos colaterais. Assim, a descoberta e identificação de novas drogas mais seguras que operam contra tumores torna-se um objetivo importante da pesquisa em ciências biomédicas (OOI; LUI, 2000).

O reforço ou potenciação dos mecanismos de defesa do hospedeiro emerge como um possível meio de inibir o crescimento tumoral sem prejudicar o hospedeiro. A partir deste ponto de vista, extensivos estudos têm sido realizados utilizando polissacarídeos extraídos principalmente de fontes vegetais e microorganismos (OOI; LUI, 2000). Os polissacarídeos vegetais são também usados na oncologia clínica para aumentar a eficácia das preparações quimioterápicas e reduzir seus efeitos colaterais (FUJIMOTO *et al.*, 1991; SCHEPETKIN; QUINM, 2006). Os polissacarídeos MRBs foram usados como adjuvantes no pós-operatório, no tratamento quimioterápico e radioterápico, bem como em terapias endócrinas em diferentes tipos de cânceres, como câncer de mama, coloretal, pulmão, gastrointestinal e de próstata. Os ensaios clínicos demonstraram que seu uso foi capaz de prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes tratados (LEUNG *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Ação de polissacarídeos em melanoma

Por se tratar de um câncer altamente resistente aos tratamentos convencionais, o melanoma têm se tornado alvo de estudos visando a utilização de polissacarídeos com efeitos antimelanoma. Um modelo de estudo estabelecido para melanoma é a utilização de células de melanoma murino, conhecidas como B16F10, obtidas de camundongos da linhagem C57BL/6 (BENNETT *et al.*, 1987). Os estudos são direcionados para avaliações *in vitro*, para verificar efeitos citotóxicos diretos sobre as células e também *in vivo*, visando avaliar a atividade antitumoral por ativação do sistema imunológico.

HAN *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento com polissacarídeo ácido de *Phellinus linteus* em camundongos portadores de melanoma (B16F10) inibiu a metástase do tumor em até 80%, com a administração de 100 mg/Kg do polissacarídeo e inibiu a adesão das células cancerosas (70%) e invasão tecidual (89%), mas não teve efeito na proliferação da célula tumoral. Já YAMAMOTO *et al.* (2009) demonstraram que a administração oral de  $\beta$ -1,3-D-Glucana purificada da *Sparassis crispa*, reduziu em torno de 30% o crescimento tumoral em camundongos portadores de melanoma, além de diminuir o número de metástase pulmonar.

Em estudo conduzido por KIM *et al.* (2006) utilizando um endo-polissacarídeo extraído de *Inonotus obliquus* (Hymenochaetaceae) em diversas linhagens tumorais, entre elas, a de melanoma (B16F10), não foi observado toxicidade direta contra as células tumorais. Por outro lado, quando foi realizada a injeção peritoneal dos polissacarídeos em camundongos com as células B16F10 implantadas, a sobrevivência dos camundongos aumentou em torno de 4 vezes. Estes resultados indicam que o efeito antitumoral do polissacarídeo não foi diretamente tumoricida mas sim imunestimulante.

A inibição de metástase pulmonar e aumento da sobrevivência também foi encontrada em estudo de YOON *et al.* (2007) e HAN *et al.* (2006), em que  $\beta$ -glucana isolada de *Saccharomyces cerevisiae* e polissacarídeo péptico isolado de *Angelica gigas nakai*, respectivamente, foram testados em camundongos com inoculação de células de melanoma. Por outro lado, estudo *in vitro* demonstrou que polissacarídeos isolados de *Phellinus gilvus* diminuíram a proliferação celular em torno de 90% e aumentou em 27% a apoptose das células B16F10 em resposta dose dependente (BAE *et al.*, 2005). Da mesma forma, uma D-glucana de *Rubus crataegifolius* apresentou citotoxicidade contra células de melanoma (NI *et al.*, 2009).

## 2.4 XILOGLUCANAS DE RESERVA

As xiloglucanas compoem uma importante família de polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas superiores e nos cotilédones de algumas sementes, nas quais atuam como polissacarídeos de reserva (FREITAS *et al.*, 2005; REID, 1985; SIMS, 1996; HSIEH; HARRIS, 2009), além de apresentar funções regulatórias, uma vez que seus oligossacarídeos, conhecidos como oligossacarinas, regulam o crescimento celular (McNEIL, 1984; HSIEH, 2009; DE LIMA; BUCKERIDGE, 2001; BUSATO *et al.*, 2001).

As sementes que acumulam carboidratos nos tecidos cotiledonares podem armazenar até 40% da massa seca na forma de xiloglucana presente nas paredes celulares de reserva. Para tal, o empacotamento destes açúcares deve ocorrer de forma muito eficiente, mantendo uma alta densidade sem impedir o acesso das enzimas hidrolíticas durante o processo de crescimento inicial das plantas, quando os polissacarídeos serão desmontados e mobilizados para os diferentes órgãos, gerando energia para os processos metabólicos (WHITNEY *et al.*, 1995). Com o passar do tempo, esses polímeros passaram a ser acumulados em maior quantidade, o que favorece sua extração para uso comercial com elevado rendimento (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

As xiloglucanas são solúveis em água, mas as macromoléculas individuais tendem a não ser totalmente hidratadas, e, conseqüentemente, as espécies agregadas permanecem presentes até mesmo em soluções muito diluídas. O biopolímero mostra um equilíbrio entre o caráter hidrofóbico e hidrofílico, e a rigidez da cadeia de celulose facilita as interações intermoleculares (NISHINARI; TAKAHASHI, 2003; JÓ, 2010). Em soluções aquosas, as xiloglucanas de sementes formam soluções viscosas e relativamente estáveis a alterações de pH, características que permitem que estes polissacarídeos sejam utilizados industrialmente (GULLFOT, 2009).

Outra característica importante das xiloglucanas é que elas não apresentam toxicidade e apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, podendo ser usadas como veículo, por exemplo, para administrar determinadas drogas. Além disso, xiloglucanas também podem ser considerados um revestimento adequado

para drogas que são administradas por via intraperitoneal, retal, percutânea e aplicações oculares (JÓ, 2010; HIRUN, 2010).

Além disso, xiloglucanas não são digeridas pelas enzimas presentes no intestino delgado humano, de modo que alcançam o cólon de maneira inalterada, podendo ser fermentadas pelas bactérias intestinais, atuando como fibras dietéticas. Por se tratar de fibras, possuem atributos nutricionais de alto valor e grande significância fisiológica (ONWELUZO *et al.*, 2002), podendo ser utilizadas na prevenção e tratamento de desordens metabólicas (SLAUGHTER *et al.*, 2002).

Estudos realizados por HENSEL e MEIER (1999) sugerem que as xiloglucanas podem ser adicionadas em alimentos com a função de agentes antimutagênicos. A xiloglucana das sementes de *Tropaeolum majus* apresentou atividade antimutagênica, com inibição dose-dependente variando de 20-50% contra o agente mutagênico 1-nitropireno. Outro estudo realizado por KATO *et al.* (2001), demonstrou que xiloglucanas extraídas da parede celular de diversas frutas comerciais e seus oligossacarídeos mostraram efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais humanas COLO 201.

No Brasil, muitas sementes de plantas podem constituir fontes promissoras de xiloglucanas, entre elas a *Copaífera langsdorffii*, a qual é fonte potencial de xiloglucanas para aplicação em alimentos e obtenção de oligossacarídeos com atividade biológica (GULLFOT *et al.*, 2009; PICOUT *et al.*, 2003; BURGALASSI *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 2008; PETKOWICZ *et al.*, 2006).

Espécies desse gênero são comumente conhecidas por Copaíba. *Copaífera Langsdorffii* pertence à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinoideae Kunth., com 28 espécies catalogadas, sendo 16 endêmicas do Brasil. É uma árvore que alcança 35 m de altura, sendo amplamente distribuída no território brasileiro, podendo ser encontrada principalmente na região amazônica, sudoeste, sudeste e sul. Aparece comumente em solos bem drenados e, de maneira geral, cresce melhor em solos de matas ciliares e matas semidecíduas, do que em solo de cerrado (FREITAS; OLIVEIRA, 2002; VEIGA JR; PINTO, 2002). Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).



No Brasil, *C. langsdorffii* é importante na medicina popular, especialmente na região amazônica. O tronco desta espécie fornece o óleo de copaíba, um líquido transparente, rico em terpenos, que é a seiva extraída mediante aplicação de furos no tronco até atingir o cerne (PAIVA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Este óleo possui diversas aplicações na área farmacêutica. Entre as propriedades medicinais atribuídas a esse gênero estão a atividade anti-inflamatória, o efeito analgésico (BASILE, 1988; FERNANDES, 1992), proteção gástrica, cicatrização de feridas cutâneas, atividade antimicrobiana (LIMA SILVA *et al.*, 2009), atividade hipotensiva, contraceptiva, anti-reumática, anti-espasmódica, laxativa e antitumoral (BRITO *et al.*, 2010). Estudo realizado por SANTOS JÚNIOR *et al.* (2010), utilizando extratos de 51 espécies de plantas brasileiras e seu efeito na citotoxicidade contra linhagens de células tumorais (B16, HL-60, MCF-7 e HCT-8) demonstrou que extratos de *Copaifera Langsdorffii* foi efetiva contra o crescimento tumoral.

Além dos polissacarídeos nativos, derivados obtidos por hidrólise parcial ou por modificações químicas como carboximetilação (SASAKI *et al.*, 1979; TAO *et al.*, 2009), oxidação e/ou introdução de novos grupos (CAO *et al.* 2009) como a complexação com certos metais tem sido estudados com sucesso como MRBs (NOLETO *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2009; DO AMARAL, 2011). Neste aspecto, a utilização de complexos de carboidratos com metais tem sido úteis na aplicação farmacológica, onde os carboidratos podem atuar como carreadores do metal (NAVARRO, 2010; YU, 2011). Entre os metais ligantes para carboidratos destaca-se o vanádio, que além de ligar a polissacarídeos pode formar complexos com diferentes compostos, para os quais são descritos efeitos como ação insulino mimética (BISHAYEE *et al.*, 2010) e antitumorais (EVANGELOUS, 2002; ZHAO, 2010; MESHKINI, 2010).

## 2.5 VANÁDIO E SUAS AÇÕES BIOLÓGICAS

O vanádio é um elemento traço amplamente distribuído na natureza, conhecido por ser essencial em pequenas concentrações, para o metabolismo normal de diversas espécies (RAY, 2006; MESHKINI, 2010). Entretanto, o seu papel como micronutriente essencial para o homem ainda é pouco conhecido



(EVANGELOUS, 2002). O vanádio pode ser encontrado tanto na forma aniônica (vanadato) quanto catiônica ( $\text{VO}^{2+}$ ), com estado de oxidação de 1 a 5 (I a V). Ambas as formas participam de processos biológicos após conjugação com as proteínas albumina e transferrina e posterior incorporação aos tecidos (BARAN, 2000; CRUZ, 2002; BISHAYEE, 2010). Nos sistemas biológicos, o vanádio pode influenciar a atividade de uma série de enzimas, regular a função de alguns segundos mensageiros e modular a expressão de genes. Estudos demonstram que o vanádio é capaz de afetar os níveis de fosforilação intracelular, via inibição não seletiva de proteínas fosfatases e desta maneira afetar vias de sinalização intracelular (MORINVILLE, 1998; BISHAYEE, 2010).

Devido à sua capacidade de interagir com biomoléculas, os efeitos biológicos do vanádio têm sido extensivamente estudados. Entre eles encontram-se o efeito de estimular a oxidação da glicose e síntese de glicogênio no fígado, mimetizando a ação da insulina; ação de antihipertensivo, antihiperlipidêmico, antiobesidade, diurético, modulação do sistema imune e leishmanicida (MATTE *et al.*, 2000; EVANGELOUS, 2002; NOLETO, 2002; ABDELHAMID, 2010, BARRIO, 2010). Em combinação com sua toxicidade relativamente baixa, estas características abrem múltiplas oportunidades para o uso terapêutico do vanádio (JUNGWITH, 2011).

Além dos efeitos anteriormente citados, diferentes trabalhos demonstram também, que o vanádio possui importante efeito antitumoral (NOBLÍA *et al.*, 2005). Os primeiros relatos na literatura acerca do efeito antitumoral do vanádio datam de 1965. Desde então esta propriedade em particular, tem sido amplamente estudada, demonstrando um efeito promissor de compostos de vanádio no tratamento do câncer, sendo capaz de inibir o crescimento tumoral, incluindo linhagens de leucemia (MESHKINI, 2010), colo de útero (FANECA, 2009), carcinoma de tireóide (GONÇALVES, 2011), carcinoma de mama (RAY, 2006), linfoma, hepatomas, ovário, rins e pulmão (BISHAYEE, 2010). Acredita-se que o vanádio exerce seu efeito antitumoral por meio da inibição de tirosina fosfatases e/ou ativação de tirosina fosforilases. Ambos os efeitos, ativam vias de transdução de sinais que conduzem para a apoptose e/ou ativam genes supressores de tumor. Uma das vias afetadas pelo vanádio é a da família de proteínas MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógenos). Uma vez ativadas, induzem a transcrição do fator NF $\kappa$ -B, um fator envolvido na progressão do ciclo celular e apoptose (MORINVILLE, 1998; EVANGELOUS, 2002). Além disso, compostos de vanádio podem induzir clivagem

do DNA, lipoperoxidação da membrana plasmática e parada de ciclo celular. Acredita-se que a clivagem do DNA ocorra por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente radicais hidroxila (EVANGELOUS, 2002). Compostos de vanádio podem também atuar como agentes antimetastáticos por inibir a indução de moléculas de adesão (FANECA, 2009).

Outro importante efeito do vanádio é o seu papel como quimiopreventivo contra a carcinogênese quimicamente induzida. Estudos demonstram que a presença do vanádio é capaz de impedir o crescimento tumoral em animais portadores de carcinoma mamário (RAY, 2005; RAY, 2006) e câncer de colo de útero (KANNA, 2005). Este efeito quimioprotetor ocorre devido à interferência do vanádio na atividade de enzimas responsáveis pela detoxificação de xenobióticos, impedindo a liberação de metabólitos carcinogênicos (ABDELHAMID, 2010).

Com base no seu efeito antitumoral, evidências sugerem que o vanádio pode ser considerado como o representante de uma nova classe de agentes antitumorais a base de metal, em substituição aos compostos atuais a base de platina (EVANGELOUS, 2002). Juntamente com o vanádio, drogas a base de outros metais como rutênio, cobre, titânio e estanho têm sido relatadas com potencial promissor no tratamento do câncer (MESHKINI, 2010).

O esquema representado na figura 4 sumariza os importantes mecanismos pelos quais o vanádio exerce seu efeito antitumoral.

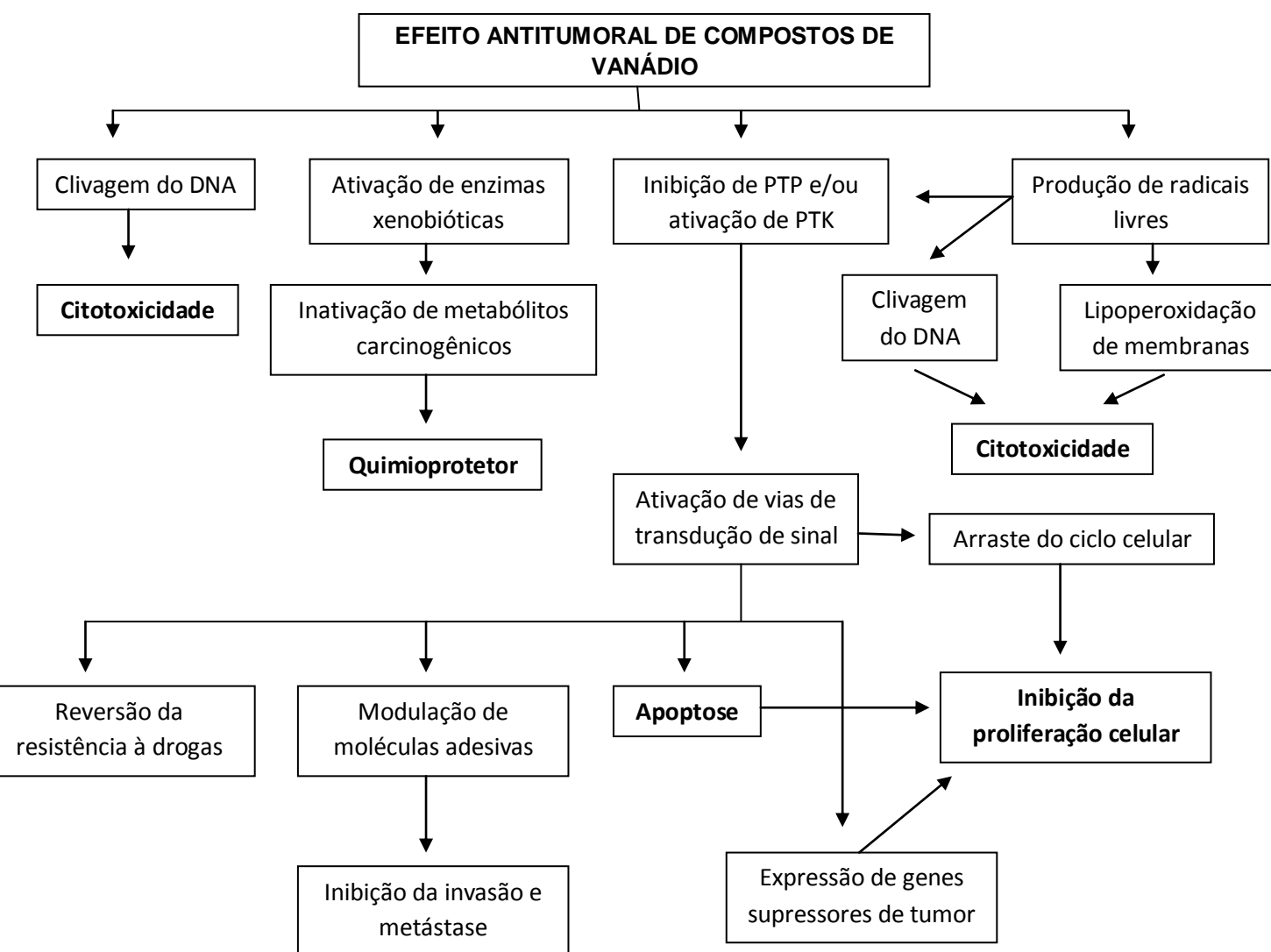


FIGURA 3: MECANISMOS DE AÇÃO PELOS QUAIS O VANÁDIO EXERCE SEU EFEITO ANTITUMORAL

FONTE: EVANGELOUS (2002), adaptado

NOTA: PTP: proteínas tirosina fosforilases; PTK: proteínas tirosina quinase.

Como o cátion  $\text{VO}^{2+}$  é provavelmente, a forma mais relevante presente nos sistemas biológicos, uma série de estudos tem sido conduzido sobre a interação deste cátion com diferentes biomoléculas e outros ligantes de interesse farmacológico (BARAN, 2000). Muitos açúcares podem reduzir o vanádio (V) a oxovanádio ( $\text{VO}^{2+}$ ), e se complexar com este cátion (BARAN, 2009). Desta forma, os carboidratos merecem especial atenção e seus complexos com vanádio tem sido descritos como ferramentas importantes na farmacologia, uma vez que o carboidrato pode atuar como carreador do metal. Além disso, uma vez o vanádio complexado com ligantes orgânicos, ele se torna mais solúvel e menos tóxico (GOLDEWASER et

al., 2000; JAKUSH *et al.*, 2003; NOLETO *et al.*, , 2009; YU, 2011). Recentemente, tem sido estudada a interação entre oxovanádio e quitosana, e sugere-se que nesta forma a quitosana atue como um veículo para a liberação controlada do vanádio no organismo (BARAN, 2009). Complexos de vanádio com carboidratos apresentaram efeito inibitório na atividade da fosfatase alcalina, mimético da insulina, redução da proliferação de osteoblastos tumorais (BARAN, 2009) e inibição da proliferação de células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009).

Neste contexto, tendo em vista os importantes efeitos biológicos dos polissacarídeos, do vanádio e de complexos de carboidratos com vanádio este trabalho teve como finalidade avaliar o efeito da xiloglucana de *C. langsdorffi* (XGC) e de seu complexo com oxovanádio (IV/V) (XGC:VO<sup>2+/3+</sup>) em células de melanoma B16F10, a fim de obter maiores informações a cerca dos efeitos antitumorais de ambos os compostos, além de comparar se a presença do vanádio teria influencia nos efeitos antitumorais.

### 3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

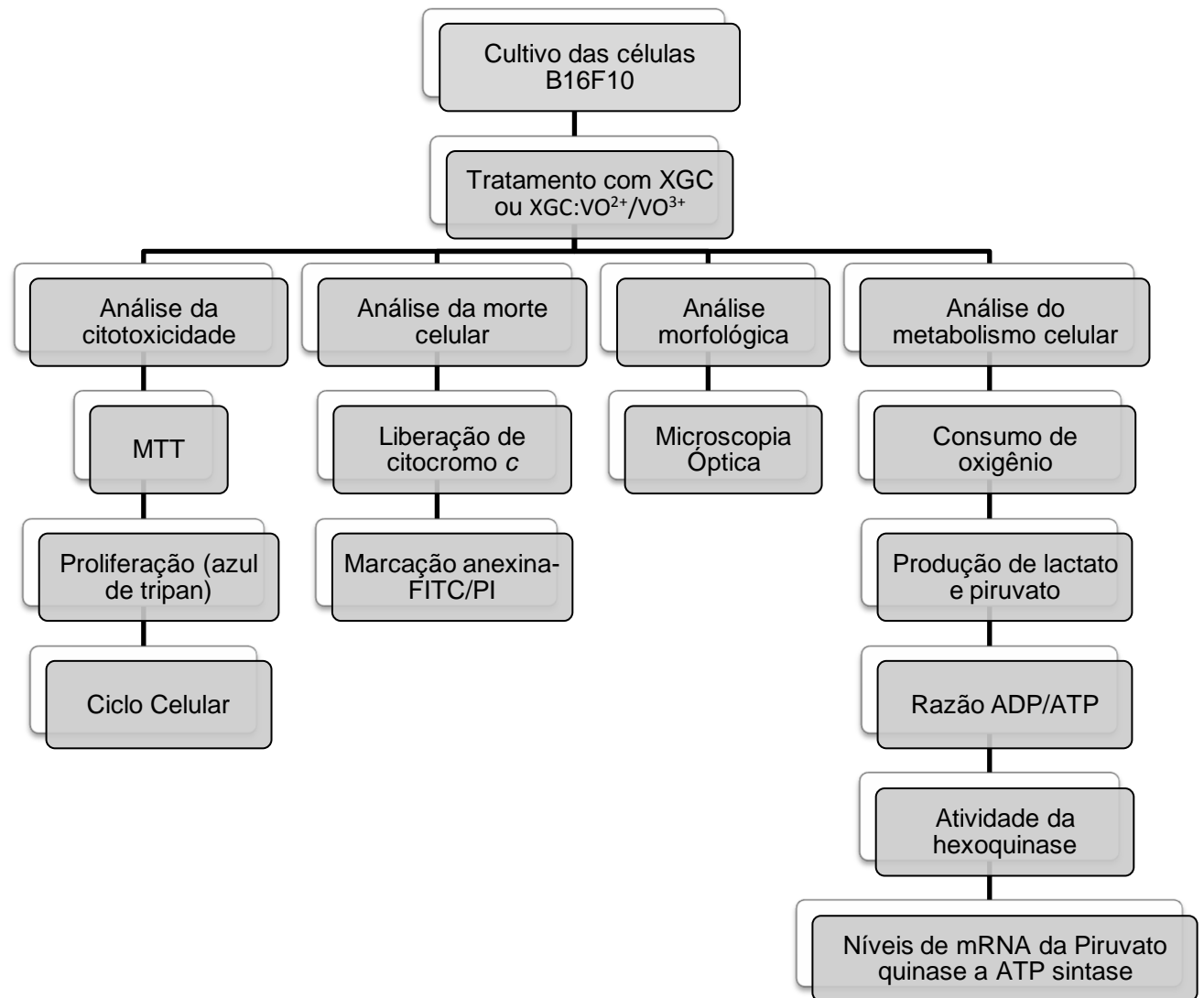


FIGURA 4: FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL DO ESTUDO.  
FONTE: O autor (2012).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes utilizados neste trabalho, adquiridos da Merck do Brasil: hidróxido de sódio, glucose, dimetilsulfóxido (DMSO), citrato de sódio, tris, fiosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico de sódio, acetonitrila, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, cloreto de potássio, ácido sulfúrico, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, entellan, glicina e hidrazina.

Os reagentes adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO): brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ácido etilenoaminotetracético (EDTA), azul de tripan, lactato desidrogenase, glucose-6-fosfato desidrogenase, NADH, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, ATP e ADP.

Os materiais adquiridos da TPP<sup>®</sup> (Techno Plastic Products): garrafas de cultura estéreis e placas de cultura multipóços estéreis.

Outros materias e reagentes utilizados: soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>), filtros Millex descartáveis 0,22 µm (Millipore), gentamicina (Cultilab), meio RPMI 1640 (Cultilab) e Anexina V-FITC (BD).

Todos os reagentes utilizados foram preparados com água ultrapura, utilizando sistema ultrapurificador Gehaka<sup>®</sup>.

### 4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES, MEIOS DE CULTURA E MATERIAIS UTILIZADOS

#### 4.2.1 Preparo das soluções de xiloglucana e de seu complexo com oxovanádio

Para a realização deste trabalho foi utilizado uma xiloglucana de reserva presente na semente de *Copaifera langsdorffii*, isolada e cedida pela Professora Dr<sup>a</sup> Carmem Lucia de Oliveira Petkowicz do grupo de Química de Carboidratos Vegetais

do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. O complexo desta xiloglucana com oxovanádio (IV/V) denominado XGC:VO<sup>2+/3+</sup> foi preparado pela professora Dr<sup>a</sup> Guilhermina R. Noletto, juntamente com as professoras Dr<sup>a</sup> Ana Lucia R. Mercê do Departamento de Química da UFPR e, a professora Dr<sup>a</sup> Carmem Lúcia de Oliveira Petkowicz.

- Solução estoque de xiloglucana: a solução estoque de xiloglucana XGC) foi preparada em PBS, pH 7,4, na concentração de 2 mg/mL. Posteriormente a solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos.

- Solução estoque de xiloglucana complexada: a solução estoque do complexo XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> foi preparada em água ultrapura na concentração de 1 mg/mL e posteriormente esterilizada por filtração em membrana de celulose com poros de 0,22 µm.

Após esterilização, a concentração de carboidratos nas soluções foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico, conforme metodologia descrita por DUBOI *et al* (1956) e de uso de rotina no Laboratório de Química de carboidratos. As soluções foram armazenadas a -20°C e no momento do uso foram diluídas em meio RPMI 1640.

#### 4.2.2 . Meio de cultura para as células B16F10.

Para o cultivo das células, foi utilizado o meio RPMI 1640 (Cultilab<sup>®</sup>), reconstituído em água ultrapura. Para a esterilização do meio após a reconstituição foi utilizado um aparelho Sartorius (alta pressão), onde a filtração foi realizada em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm. Para ajustar o pH desse meio foi utilizado solução de bicarbonato (7,5%) e para o tamponamento do meio em pH 7,4 o HEPES (pH 7,0), esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm. O bicarbonato utilizado foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm por 30 minutos. Depois de preparado, algumas alíquotas do meio foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas, para verificação de contaminação. Não ocorrendo contaminação, o estoque do meio foi mantido em geladeira a 4°C. Para a utilização na cultura de células B16F10, o meio

foi preparado adicionando 7,5% de soro fetal bovino estéril e gentamicina (0,125%). No momento do uso, o meio foi previamente aquecido a temperatura de 37°C.

#### 4.2.3 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA utilizada foi constituída de NaCl 137 mmol/L, KCl 5,4 mmol/L, glucose 5 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,42 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L, 50 mg/% tripsina (1:250) e 2 mg/% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio 8 mmol/L. Posteriormente, a solução foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  sob pressão em aparelho Sartorius. A solução foi armazenada em frascos estéreis e mantida em geladeira a 4°C.

#### 4.2.4 Solução salina fosfato tamponada (PBS)

A solução foi preparada na forma de estoque 5 vezes concentrada, dissolvendo os seguintes componentes em água ultrapura: NaCl 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40,5 mmol/L. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 litro em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120 °C, 1 atm, por 40 minutos e armazenada a temperatura ambiente.

#### 4.2.5 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi constituída da mistura de duas soluções (A e B), preparadas como soluções estoque 20x concentradas. A solução A foi composta de NaCl, 2,73 mol/L, KCl, 107 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  25 mmol/L e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27 mmol/L. A solução B foi composta por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,5 mmol/L e



glucose 111 mmol/L. Essas soluções foram preparadas em água bidestilada em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Na utilização do HBSS, as soluções A e B foram misturadas (1:1) e posteriormente diluídas com água bidestilada e o pH ajustado para 7,4. A solução foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm em câmara de fluxo laminar vertical.

#### 4.2.6 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (PI)

A solução foi preparada em 200 mL de PBS, utilizando 50 µg/mL de PI, 0,1% m/v de citrato de sódio, 0,1% v/v de Triton X-100 e 0,1% m/v de RNase A. Posteriormente, a solução foi armazenada a 4° C ao abrigo da luz.

#### 4.2.7 Solução de iodeto de propídeo (PI) não desnaturante

Para a solução não desnaturante de PI, foi adicionado 10 µg/mL de PI à 100 mL de PBS. A solução foi armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

#### 4.2.8 Tampão de ligação Anexina V- FITC

O tampão de ligação foi preparado em 300 mL de HEPES 10 mmol/L (pH 7,4) contendo NaCl 150 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L e CaCl<sub>2</sub> 1,8 mmol/L. O tampão foi armazenado a 4°C.

#### 4.2.9 Esterilização dos materiais utilizados

Todos os materiais utilizados no laboratório de cultivo celular foram esterelizados antes do uso. Os materiais como frascos de vidro para condicionamento de soluções, pipetas de vidro, ponteiros plástica para pipetador automático, equipamento para filtração sob pressão e eppendorfs foram esterilizados em autoclave (Fanem) a 120 °C, durante 30 min, sob pressão de 1 atm e posteriormente secos em estufa a 37 °C.

Demais materiais plásticos, tais como garrafas de cultivo celular, placas multipos e tubos falcon foram esterilizados em microondas por 45 minutos em potência 50%.

## 4.3 CULTIVO CELULAR

### 4.3.1 Linhagem Celular

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem celular B16F10 de melanoma murino, gentilmente cedido pelo Professor Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As células de melanoma murino (B16F10) foram cultivadas em garrafas Techno Plastic Products (TPP) estéreis com meio de cultura RPMI 1640, acrescido de soro fetal bovino (7,5%), HEPES (20 nmol/L) e  $\text{NaHCO}_3$  (8 mmol/L) e gentamicina (0,125%). As células foram mantidas em estufa com condições apropriadas para seu crescimento (5%  $\text{CO}_2$ , 95% de umidade e 37°C).

O repique das células foi realizado conforme a necessidade, seguindo protocolo padrão do laboratório de cultivo celular, utilizando solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas às garrafas.

## 4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), de acordo com metodologia descrita previamente por MOSMANN (1983). O MTT é um método colorimétrico baseado na capacidade de desidrogenases de células viáveis reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan (MOSMANN, 1983).

Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $10^4$  células/poço e armazenadas em estufa com condições adequadas para aderirem (5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ ). Após 24 horas de permanência na estufa, foram adicionados os polissacarídeos em estudo, XGC e XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  em diferentes concentrações: de 5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  para XGC e de 2,5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  para XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ . As células foram então, mantidas em estufa pelos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após o período de tratamento, foi adicionada a solução de MTT (180  $\mu\text{L}$  de HBSS + 20  $\mu\text{L}$  de MTT) e as células foram mantidas novamente em estufa, por um período de três horas. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi recolhido e o DMSO foi adicionado à placa para solubilizar os cristais de formazan formado. A absorbância foi lida em 550 nm em leitor de microplacas (Tecan infinite 200).

#### 4.4.2 Curva de proliferação

A avaliação da proliferação celular foi realizada pelo método de exclusão do azul de Trypan. A técnica baseia-se na capacidade deste corante penetrar no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática, sendo estas consideradas como células não viáveis. Para tanto, foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. As células foram mantidas em estufa nas condições adequadas para sua adesão conforme anteriormente citado. Após 24 horas, o meio foi substituído por outro contendo os polissacarídeos em estudo nas concentrações de 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  para XGC e 1; 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  para XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  e este momento foi considerado o tempo 0 para a construção da curva de crescimento. As células foram então, mantidas em estufa pelos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. Após cada tempo de tratamento, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram soltas adicionando-se tripsina-EDTA e ressuspensas em meio RMI 1640. A solução de azul de Trypan 0,4% m/v em PBS,

foi adicionado à suspensão de células na proporção de 1:10 corante:amostra e imediatamente em seguida, as células não coradas pelo azul de Trypan, ou seja, as células viáveis, foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico (OLYMPCUS, mod.KW1).

#### 4.4.3 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Células B16F10 foram plaqueadas na densidade de de  $5 \times 10^5$  células em placas de plástico de 60 mm de diâmetro. Após 24 horas de adesão em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado e realizado o tratamento das células com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL, ambos pelo tempo de 24 horas. Após o tempo de tratamento as células foram coletadas para análise em citômetro de fluxo. Inicialmente, o sobrenadante foi coletado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e coletadas após a adição de tripsina-EDTA e posterior inativação com meio de cultura. As células foram centrifugadas a 500g por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular obtido, foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se 300 µL de tampão hipotônico de iodeto de propídeo ao *pellet* celular. A suspensão foi mantida por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz. A análise do ciclo celular foi realizada em aparelho FACScalibur (BD), adquirindo-se 10.000 eventos utilizando o filtro de fluorescência FL2. As análises foram realizadas pelo *software* WinMDI 2.9, utilizando histograma, sendo no eixo X o filtro FL2 e no eixo Y o número de eventos.

#### 4.4.4 Morfologia celular

##### 4.4.4.1 Microscopia óptica

As células B16F10 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após o período de 24 horas de adesão em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi retirado e substituído por meio RPMI 1640 contendo os polissacarídeos em estudo na concentração de 2,5; 10; 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 1; 5; 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  e as células foram mantidas em estufa pelo tempo de 24 horas. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS para posterior fixação com *Bouin* (formaldeído: ácido pícrico saturado: ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos. Em seguida as células foram desidratadas em solução etanólica 70% e coradas com hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos. O excesso do corante foi retirado com água ultrapura. Posteriormente, procedeu-se a coloração com eosina pelo tempo de 30 segundos, sendo o excesso retirado com álcool 70%. Após coloração, as células foram desidratadas em soluções de acetona e xilol e montadas em lâminas com Entellan.

As micrografias foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX40 com câmera de captura DP071 acoplada.

#### 4.4.5 Avaliação da morte celular

##### 4.4.5.1 Ensaio de liberação de citocromo c

A avaliação da liberação de citocromo c foi realizada de acordo com metodologia descrita por PICKLO *et al.* (1999) e APPAIX *et al.* (2000), com algumas modificações.

As células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células/placa em placas de 60 mm e acondicionadas por 24 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  para aderirem. Após adesão, as células foram tratadas com as concentrações de 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  pelo tempo de 24 horas. Após este tempo, as células foram coletadas com adição de tripsina e ressuspensas em meio de cultura. Dessa suspensão celular, 50  $\mu\text{L}$  foi reservado para a determinação de proteínas pelo método de Bradford (1956). O restante da suspensão foi centrifugado

e o *pellet* ressuspenso em 200  $\mu$ L da solução de permeabilização da membrana, composta por TRIS-HCl 10 mg/mL pH 7,2; EGTA 3 mg/mL, sacarose 50  $\mu$ g/mL, digitonina 10  $\mu$ mol/L e o inibidor de protease PMSF, para impedir a degradação do citocromo c liberado. Em seguida, as células foram mantidas em gelo por 30 minutos para a permeabilização da membrana plasmática. A permeabilização da membrana foi confirmada com a utilização do corante azul de Trypan 0,4% m/v em PBS, em uma alíquota da suspensão celular. Confirmada a permeabilização, as células foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de PVDF 0,22  $\mu$ m, tendo sua absorbância lida em 414 nm em leitor de microplacas (Epoch).

A concentração de citocromo c liberada foi calculada usando o  $\epsilon$  de 100  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ , e os resultados expressos em nmol de citocromo c liberado/mg proteína.

#### 4.4.5.2 Marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo

A avaliação da morte celular foi determinada como descrito por Bossy-Wetzel e Green (2000), com algumas modificações. As células foram plaqueadas em placas de 60 mm na densidade de  $5 \times 10^5$  células por placa e deixadas para aderir por 24 horas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Após aderência, as células foram tratadas com as concentrações de 10, 25 e 200  $\mu$ g/mL de XGC e 5, 25 e 200  $\mu$ g/mL de XGC: $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ , ambos por 24 horas. Após o tratamento, o sobrenadante foi coletado e as células lavadas duas vezes com PBS. As células aderidas foram tripsinizadas e posteriormente centrifugadas a 500g por 3 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas uma vez com PBS. Ao *pellet*, adicionou-se 1 mL de tampão de ligação Anexina V-FITC e desta suspensão, 100  $\mu$ L foi transferido para um eppendorf. A este eppendorf, foi adicionado 5  $\mu$ L de anexina V-FITC (BD) e 10  $\mu$ L de solução de PI não desnaturante. A suspensão foi então mantida por 20 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

As células foram avaliadas em citômetro de fluxo, no aparelho FACScalibur (BD), sendo adquiridos 10.000 eventos utilizando os filtros FL1 para anexina V e FL2

para PI, por meio do programa CellQuest. As análises foram realizadas utilizando um gráfico do tipo dot-plot (eixo X: filtro FL1 e eixo Y: filtro FL2) pelo *software* WinMDI versão 2.9.

#### 4.4.6 Análise do metabolismo da célula tumoral

##### 4.4.6.1 Consumo de oxigênio

A velocidade do consumo de oxigênio pelas células B16F10 foi avaliada em oxígrafo OROBOROS<sup>®</sup>. As células foram plaqueadas na densidade de  $10^6$  células por placa em placas de 60 mm de diâmetro e deixadas para aderir em estufa pelo período de 24 horas. Após este tempo, as células foram tratadas nas concentrações de 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> pelo período de 24 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e reservado para a análise da produção de lactato e piruvato, conforme descrito no item 4.4.6.2. As células aderidas foram soltas com solução de tripsina-EDTA, ressuspensas em meio de cultura e centrifugadas a 4.000 rpm por 3 minutos a 4°C. Ao *pellet* foi adicionado 2 mL de meio de cultura para ressuspender as células e em seguida a suspensão foi adicionada à câmara fechada, termostatizada (37°C) e sob agitação constante do oxígrafo.

A reação foi iniciada com a adição da suspensão de células à câmara, sendo este período caracterizado como o estado basal da respiração. Em seguida, foi adicionado oligomicina (2  $\mu\text{g/mL}$ ), um inibidor da ATP sintase, sendo este período caracterizado como o estado *Leak* da respiração. Em seguida, foi adicionado o desacoplador FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ), e o consumo de oxigênio neste estado caracterizado como desacoplado foi acompanhado por mais alguns minutos. Por fim, para cessar a respiração mitocondrial, foram adicionados os inibidores da cadeia de transporte de elétrons, rotenona (0,5 mM) e antimicina (3  $\mu\text{g/mL}$ ).

O consumo de oxigênio foi expresso como fluxo de oxigênio/células [pmols/seg/  $10^6$  células]

#### 4.4.6.2 Produção de lactato e piruvato

Como descrito anteriormente, o sobrenadante das células tratadas para o ensaio de consumo de oxigênio (item 4.4.6.1), foi utilizado para a determinação de lactato e piruvato.

O ensaio foi realizado seguindo metodologia descrita por CZOC (1974) e GUTMAN (1974) modificado. O lactato foi dosado em volume final de 300  $\mu$ L, em meio de reação contendo tampão glicina 0,1M - hidrazina 0,4 M pH 9,5,  $\text{NAD}^+$  1,5 mM, lactato desidrogenase 1,5 U e 150  $\mu$ L de amostra. O sistema foi mantido em estufa a 37°C por 90 minutos e a quantidade de NADH formada foi determinada em 340 nm em leitor de microplacas (Epoch). Para a determinação de piruvato, o volume final também foi de 300  $\mu$ L, em uma mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4, NADH 0,15 mM, lactato desidrogenase 0,05 U e 150  $\mu$ L de amostra. A quantidade de NADH oxidada foi avaliada espectrofotometricamente em 340 nm após 20 minutos de incubação a 37°C.

A concentração lactato e piruvato foi avaliada de maneira indireta de acordo com a concentração de NADH presente no meio, considerando o  $\epsilon$  de 6220  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ , e os resultados expressos em nmol de NADH/mg proteína.

#### 4.4.6.3 Determinação da razão ADP/ATP

A determinação da quantidade de ADP e ATP intracelulares foi realizada conforme metodologia descrita por VIVES-BAUZA (2007), com algumas modificações. As células foram plaqueadas na densidade de  $10^6$  células por placa, em placas de 60 mm de diâmetro. Após a permanência de 24 horas em estufa (37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ ) para adesão, as células foram tratadas com as concentrações de 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 1, 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  e mantidas por mais 24 horas em estufa. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e mantidas a -20°C por 30 minutos após adição de 0,5 mL de ácido perclórico 0,4 mol/L. Em seguida, as células foram descongeladas em gelo e coletadas com o auxílio de *cell scrapers*. A suspensão foi centrifugada a 16.700 g



por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi neutralizando com a utilização de  $\text{KHCO}_3$  4 mol/L na proporção de 1:10 de ácido:sobrenadante. Após neutralização, o sobrenadante foi mantido em gelo por 10 minutos e posteriormente em freezer a -20°C por 2 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16.700 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) da empresa Shimadzu.

Para a análise, foi utilizado uma coluna C18 (Phenomenex®) de 5  $\mu\text{m}$ , com diâmetro de 250 mm x 4,6 mm e empregado um gradiente composto de uma solução A (25 mmol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 100 mg/L de tetrabutilamônio, pH 5,0) e uma solução B (200 mmol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 100 mg/L de tetrabutilamônio e 10% de acetonitrila, pH 4,0). O gradiente iniciava com 0% de tampão B, que aumentava para 100% em 30 minutos diminuía novamente para 0% em 10 minutos, permanecendo assim por mais 10 minutos, totalizando um tempo de corrida de 50 minutos a um fluxo de 1 mL/minuto, utilizando detecção no UV a 260 nm. As áreas dos picos foram analisadas e expressas em  $\mu\text{mol/L}$  utilizando uma curva de calibração, construída a partir de padrões de concentrações conhecidas de ADP e ATP, dissolvidos em ácido perclórico e neutralizados com  $\text{KHCO}_3$ , da mesma maneira que as amostras celulares.

A razão foi determinada dividindo-se a concentração de ADP obtida pela concentração de ATP.

#### 4.4.6.4 Atividade da hexoquinase

Células B16F10 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células por placa em placas de 60 mm de diâmetro e mantidas em estufa a 37°C com 5 % de  $\text{CO}_2$  para aderência. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 10, 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 5, 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  pelo período de 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas conforme metodologia descrita por PENSO; BEITNER (1998). Após o período de tratamento, o meio foi dispensado em tubo de centrifuga e as células coletadas com tripsina-EDTA. A seguir as células foram centrifugadas por 10 minutos a 270g a 4°C. O *pellet* celular foi submetido ao homogeneizador Potter por 90 segundos em 0,5 mL

de sacarose 0,25 M gelada. Amostras de 50  $\mu$ l foram reservadas para dosagem de proteínas. O homogeneizado foi posteriormente centrifugado a 4°C por 10 minutos a 1000g para remoção dos *debris* celulares.

A atividade da hexoquinase foi medida por método colorimétrico como descrito por MICCOLI *et al* (1996), com algumas modificações. A mistura de reação em um volume final de 300  $\mu$ L foi constituída de: tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8; 0,25 mM de  $MgCl_2$ ; 0,05 mM de  $NADP^+$ ; 0,25 U/ml de glucose-6-fosfato desidrogenase; 0,1 mM de glucose; 5 mM de ATP e 100  $\mu$ l do homogeneizado celular. A reação foi iniciada pela adição da amostra e a absorbância de NADPH formado foi acompanhada em leitor de microplacas (Epoch) a 340 nm.

A atividade enzimática foi avaliada de acordo com a quantidade de NADPH formado por mg de proteína, considerando o  $\epsilon$  de 6220  $mmol^{-1}.L.cm^{-1}$  e expressa em porcentagem em relação ao controle.

#### 4.4.7 Avaliação da expressão da Piruvato quinase e ATP sintase

##### 4.4.7.1 Extração e purificação do RNA celular

Células B16F10 foram plaqueadas em placas de plástico de 60 mm de diâmetro, na densidade de  $5 \times 10^5$  células por placa. Após 24 horas de adesão em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ , o meio foi retirado e as células tratadas nas concentrações de 25 e 200  $\mu$ g/mL de XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> e mantidas por mais 24 horas em estufa. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas utilizando solução de tripsina-EDTA. A suspensão obtida foi centrifugada a 4.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, as células foram lavadas, adicionando-se 1 mL de PBS ao pellet celular e realizada novamente uma centrifugação por 3 minutos a 4.000 rpm. A sobrenadante foi retirado delicadamente, e o pellet celular armazenado a -80°C para posterior extração do RNA.

O RNA celular foi extraído utilizando o Kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lisadas e homogeneizadas com tampão RLT ( $\beta$ -mercaptanol/guanidina-tiocianato). Em

seguida, foi adicionado etanol 70% e realizado a filtração do RNA em colunas de sílica após lavagem com diferentes tampões (RW1 e RPE). O RNA purificado que ficou retido na coluna, foi então eluído com água livre de RNAses. Posteriormente, o RNA foi quantificado em aparelho Nanodrop 1000 - Thermo Scientific), verificando a absorbância na faixa de 260 a 280 nm. Após a quantificação, a integridade do RNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.4.7.2 Síntese de cDNA

Após a confirmação da integridade do RNA obtido, procedeu-se a síntese de DNA complementar com a utilização do Kit comercial ImProm II Reverse Trascrption System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para este fim, 1 µg de RNA total extraído foi transferido para um eppendorf e o seu volume foi ajustado para um volume final de 6,5 µL. Em seguida, foi adicionado 1 µL de DNase I, 1 µL de Tampão suplementado com cloreto de magnésio e 0,5µL de inibidor de RNase (RNase out). Na sequência, as amostras foram incubadas em termociclador (Eppendorf) a 37°C por 10 minutos e em seguida a 70°C por 5 minutos para que ocorra a inativação da enzima. Após este período, as células foram tratadas com DNase I e 1 µL de Oligo (dT) foi adicionado para o anelamento da cauda poli (A). As amostras foram novamente incubadas a 70°C por 5 minutos. A cada eppendorf, foi adicionado 10 µL da mistura de reação [0,5 µL de água livre de RNases; 4 µL de ImProm II Tampão de reação 5x; 4 µL de Cloreto de magnésio 5 mmol/L; 1 µL de Mix de dNTPs (0,5 mmol/L de cada); 0,5 µL de RNAsin (inibidor de RNase) e 1 µL de ImProm II Transcriptase reversa] e incubados a 25°C por 5 minutos. Em seguida, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador (Eppendorf) a 42°C pelo tempo de 60 minutos. Decorrido este tempo, a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos.

Após a síntese, o cDNA foi diluído na proporção 1:3 com água livre de RNase e armazenado a -80°C.

#### 4.4.7.3 Avaliação da expressão gênica

Para a análise da expressão gênica foi utilizado a metodologia de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para tanto, foram utilizados iniciadores específicos para os transcritos da enzima da via glicolítica Piruvato quinase isoforma M2 (PK-M2) e da ATP sintase, subunidade beta F1, da cadeia de transporte de elétrons. A sequência dos iniciadores está descrito na tabela abaixo:

TABELA 1: INICIADORES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE RT-qPCR

<b>GAPD (FORWARD)</b>	5' ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG-3'
<b>GAPD (REVERSE)</b>	5' GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
<b>HPRT (FORWARD)</b>	5' TCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3'
<b>HPRT (REVERSE)</b>	5' AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG-3'
<b>PK-M2 (FORWARD)</b>	5' TATCGCAGCAGGAACCGAAGTACGC-3'
<b>PK-M2 (REVERSE)</b>	5' TGCATGGAGCTGCTGGGTCTGAA-3'
<b>ATP SINTASE SUBUNIDADE BETA (FORWARD)</b>	5' CCGACATGGGCACAATGCAGGAA-3'
<b>ATP SINTASE SUBUNIDADE BETA (REVERSE)</b>	5' ATGGGCAAAGGTGGTTGCAGGG-3'

FONTE: O autor (2012)

A reação de RT-qPCR foi realizada em aparelho Rotor-Gene Q (Corbett Reserch) com a utilização dos reagentes do Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen). A constituição da mistura de reação foi de 4,5 µL de cDNA 1:30; 4,5 µL dos iniciadores F (forward) e R (reverse); 9 µL de Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, constituído de HotStarTaq Plus DNA polimerase, tampão da polimerase, mistura de dNTPs e água livre de RNase, sendo o volume final da mistura de reação de 18 µL. As amostras foram incubadas a 95°C pelo período de 5 minutos e, em seguida realizado cerca de 45 ciclos de amplificação para gene em estudo. Em cada ciclo as amostras permaneceram por 10 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C. Por fim, foi realizado a dissociação variando-se a temperatura de 60°C a 90°C.

Os valores de CT dos genes foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados pelos genes de controle interno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e HPRT (hixantina fosforibosiltransferase) com o auxílio do software geNorm 3.4.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prism versão 5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). para Windows para análise estatística dos resultados, empregando-se a análise de variância ANOVA (fator duplo) seguida do pós teste de Tukey. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10

A viabilidade de células B16F10 foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT. Este ensaio tem sido extensivamente utilizado para indicar citotoxicidade, uma vez que baseia-se na dosagem da atividade metabólica das células viáveis, capazes de reduzir os sais tetrazólio por meio de reação enzimática catalizada pelo complexo succinato tetrazólio redutase, formando um composto colorido, detectado a 550 nm (MOSMANN, 1983).

Este ensaio foi realizado para determinar as concentrações de xiloglucana e de seu complexo a serem utilizadas nos experimentos seguintes. Para tanto, foram testadas as concentrações de 5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 2,5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> (0,0075 mM - 0,9 mM de VO<sup>2+/3+</sup>), ambos nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição ao composto. Os resultados destes ensaios estão apresentados na figura 5. Na figura 5A observa-se que o polissacarídeo na sua forma nativa apresentou efeito citotóxico em todas as condições avaliadas, no entanto, o efeito encontrado não foi dose e nem tempo dependentes. Foi observado uma redução de aproximadamente 20% na viabilidade celular já na concentração mais baixa do polissacarídeo (5  $\mu\text{g/mL}$ ) no tempo de 24 horas de tratamento. A partir da concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , a viabilidade celular foi reduzida em cerca de 50% nos três tempos de exposição, indicando uma possível adaptação da célula aos efeitos provocados pelo polissacarídeo.

Da mesma maneira, o tratamento com o complexo XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> também apresentou efeito citotóxico em todas as condições avaliadas (figura 5B), sendo este efeito tempo dependente. Na menor concentração avaliada, ou seja, 2,5  $\mu\text{g/mL}$  observa-se uma redução de ~23% na viabilidade celular em 24 horas de tratamento. A redução da viabilidade foi mais pronunciada nas concentrações maiores, sendo de ~66% para o o tratamento de 300  $\mu\text{g/mL}$  de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> no tempo de 72 horas. Este resultado demonstra que a presença do metal potencializou o efeito citotóxico do polissacarídeo.

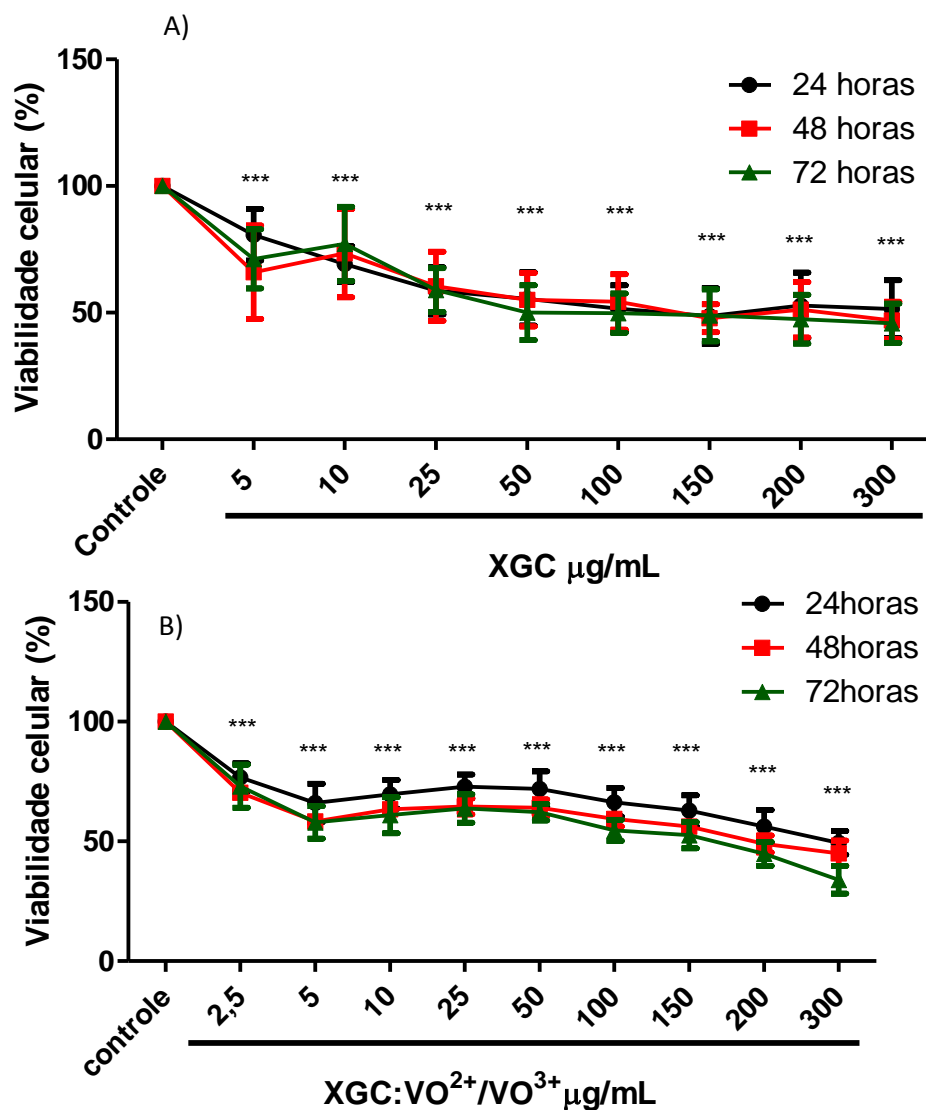


FIGURA 5: EFEITO DE XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10  
 FONTE: O autor (2012)

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT conforme descrito em Materiais e métodos (item 4.4.1) após o tratamento com XGC nas concentrações de 5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  (A) e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 2,5 a 300  $\mu\text{g/mL}$  (B), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O grupo controle, considerado como 100% de viabilidade, representa o grupo tratado apenas com o meio de cultura. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes realizados em quintuplicata. \*\*\*p<0,001 em relação ao controle, para os 3 tempos de tratamento.

A ação de polissacarídeos têm sido extensivamente estudados em diferentes linhagens celulares, demonstrando importante efeito antitumoral. HUNG e colaboradores (2012) demonstraram que polissacarídeos isolados de *Zizyphus*

*jujuba*, foram capazes de diminuir a viabilidade de células de melanoma de uma maneira dose dependente, com doses variando de 2,5 a 5 mg/mL pelo tempo de 24 e 48 horas de tratamento. Da mesma maneira, BAE e colaboradores (2005) demonstraram uma inibição de 90% no crescimento de células de melanoma (B16F10) após tratamento com 300 mg/mL de polissacarídeo isolado de fungos por 48 horas. No entanto, observa-se que as concentrações utilizadas por estes autores foram elevadas, na ordem de mg, enquanto que no presente estudo foram observados efeitos similares em concentrações em µg. Em linhagens de células de câncer de cervix uterino (HeLa) foi demonstrado que um polissacarídeo isolado de *Angelica Sinensis* diminuiu a viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT, de maneira dose dependente, nas concentrações de 3 a 100 µg/mL (CAO, 2006). Da mesma forma, polissacarídeos de diferentes fontes demonstraram diminuir a viabilidade de células de câncer de mama (THETSRIMUANG *et al*, 2011); câncer de pulmão (CHEN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2012), câncer gástrico (YANG *et al.*, 2012) e hepatocarcinoma (ZHANG *et al.*, 2006), em concentrações que variaram de 3 µg/mL até 1 mg/mL. Em linhagens de câncer gástrico (AGS) e leucemia (U937) foi observado que polissacarídeo extraído de *Ginkgo biloba*, reduziu a viabilidade celular de maneira dose dependente, nas concentrações de 40 a 640 µg/mL, especialmente a fração acetilada do polissacarídeo (WU *et al.*, 2011).

Especificamente para as xiloglucanas, KATO e colaboradores (2001) demonstraram que este polissacarídeo e seus oligossacarídeos extraídos de frutas comerciais diminuíram o crescimento de células de carcinoma de cólon humano (COLO 201), especialmente quando resíduos de fucose e/ou galactose estavam presentes na estrutura, demonstrando assim, que seu efeito foi dependente da estrutura das cadeias laterais das xiloglucanas. Já em estudo conduzido por SILVEIRA (2010), a xiloglucana extraída do Jatobá não exerceu toxicidade frente a células HeLa, nas doses que variavam de 5 a 200 µg/mL, em um tempo de exposição de 48 horas. CAO e colaboradores (2009) em estudo utilizando xiloglucana comercial, xiloglucana sulfatada e uma xiloglucana com adição de selênio à sua estrutura, observaram que a forma nativa do polissacarídeo não apresentou toxicidade contra células de hepatocarcinoma (HepG2). Por outro lado, a adição de grupos sulfato ou selênio, tornou o polissacarídeo citotóxico, promovendo a redução da viabilidade celular em cerca de 30% e 25%, respectivamente, na concentração de 1 mg/mL.



No presente estudo, os ensaios de viabilidade celular indicaram que a adição de oxovanádio (IV/V) à molécula, parece potencializar o efeito citotóxico do polissacarídeo nativo (FIGURA 5B). Neste contexto, NOLETO e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos de um complexo de galactomanana extraída de *M. scabrella* com o oxovanádio (IV/V) em células HeLa. Naquele trabalho, os autores avaliaram o complexo com a galactomana inativada enzimaticamente (GALMAN-A:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) e a galctomanana parcialmente degradada pela ação de glicosidases endógenas (GALMAN-B:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>). Os resultados demonstraram que as duas preparações nas concentrações de 50 a 200 µg/mL por 24 horas foram capazes de reduzir a viabilidade destas células, de uma maneira não dependente da concentração. No entanto, GALMAN-B:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> apresentou maior toxicidade. Segundo os autores, este complexo apresenta mais sítios de ligação para o oxovanádio, devido à sua degradação parcial, com isso este complexo pode apresentar quantidades mais elevadas do metal.

O efeito antitumoral do vanádio tem sido recentemente estudado. Foi demonstrado que este metal foi capaz de reduzir a viabilidade de células de leucemia (K562) em concentrações de 6 a 32 µM (MESHKINI *et al.*, 2010). Da mesma forma, compostos de vanádio também reduziram a viabilidade de células HeLa em concentrações de 1 a 200 µM, sendo o resultado dose dependente (FANECA *et al.*, 2009).

Estes resultados sugerem que o efeito citotóxico depende da estrutura do polissacarídeo e do tipo celular que está sendo avaliado. Com base nos resultados dos ensaios de viabilidade, representados na figura 5, foram determinadas as concentrações de 2,5; 10 e 25 µg/mL de XGC e 1, 5 e 25 µg/mL de XGC:VO<sup>2+/3+</sup> para os ensaios de proliferação celular, cujos resultados estão apresentados no item seguinte.

## 5.2 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A PROLIFERAÇÃO PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16F10

A proliferação das células B16F10 tratadas com o polissacarídeo e sua forma complexada ao vanádio, em diferentes tempos, foi avaliada utilizando-se o método

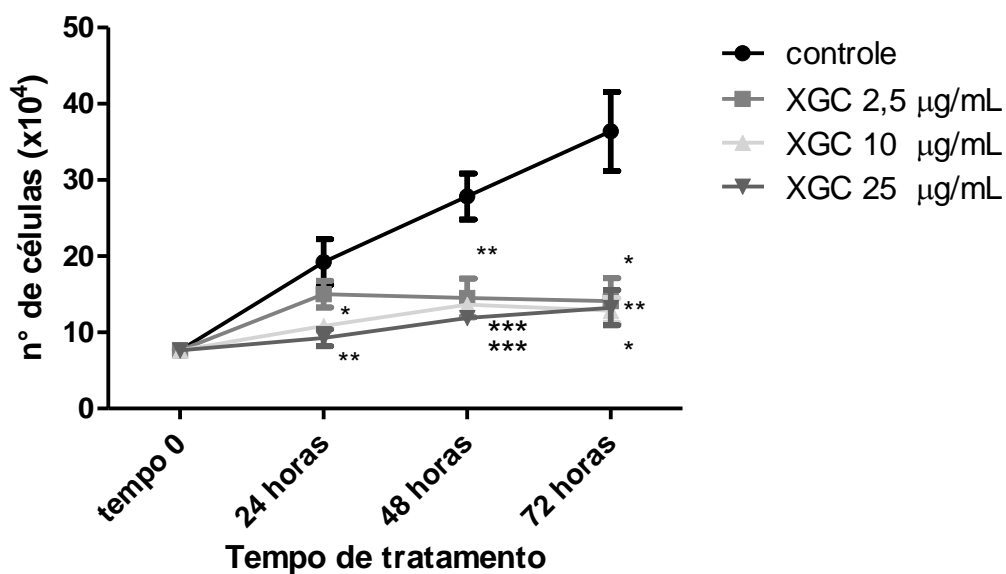
de exclusão do corante azul de Tripán pelas células viáveis. Este método avalia a integridade da membrana plasmática, uma vez que a célula se torna permeável ao corante quando há um comprometimento de sua permeabilidade, sendo estas consideradas inviáveis.

A figura 6A mostra o resultado obtido para a curva de proliferação quando as células foram tratadas com a xiloglucana nativa. Observa-se uma acentuada redução na proliferação celular, dependente da concentração do polissacarídeo. No tempo de 24 horas de tratamento, ocorre uma redução de ~20%, 37% e 46% na proliferação destas células, quando tratadas com 2,5; 10 e 25 µg/mL de XGC, respectivamente, em relação ao controle. Já no maior tempo de exposição ao composto, a redução da proliferação foi mais acentuada alcançando ~48%, ~ 52% e ~51%, para as mesmas concentrações (2,5; 10 e 25 µg/mL de XGC, respectivamente), em relação ao controle.

Para as células tratadas com o complexo  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ , observa-se também, uma importante redução na proliferação celular após 24, 48 e 72 horas de exposição ao complexo (figura 6B). Em 24 horas, o tratamento provocou uma redução de ~ 38%, ~ 50% e ~ 52% na proliferação celular, para as concentrações de 1, 5 e 25 µg/mL de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ , respectivamente, em relação ao controle. Já em 72 horas, da mesma maneira que para as células tratadas com XGC, a inibição no crescimento destas células foi mais acentuada, sendo de ~55%, 53% e ~71% para 1, 5 e 25 µg/mL de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ , respectivamente, em relação ao controle.

Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados para a viabilidade celular, indicando um efeito citotóxico de XGC e seu complexo com oxovanádio,  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ . Ao analisarmos os resultados da curva de proliferação dos dois compostos em estudo, é possível perceber que a presença do metal culmina em uma maior redução na proliferação das células B16F10.

A)



B)

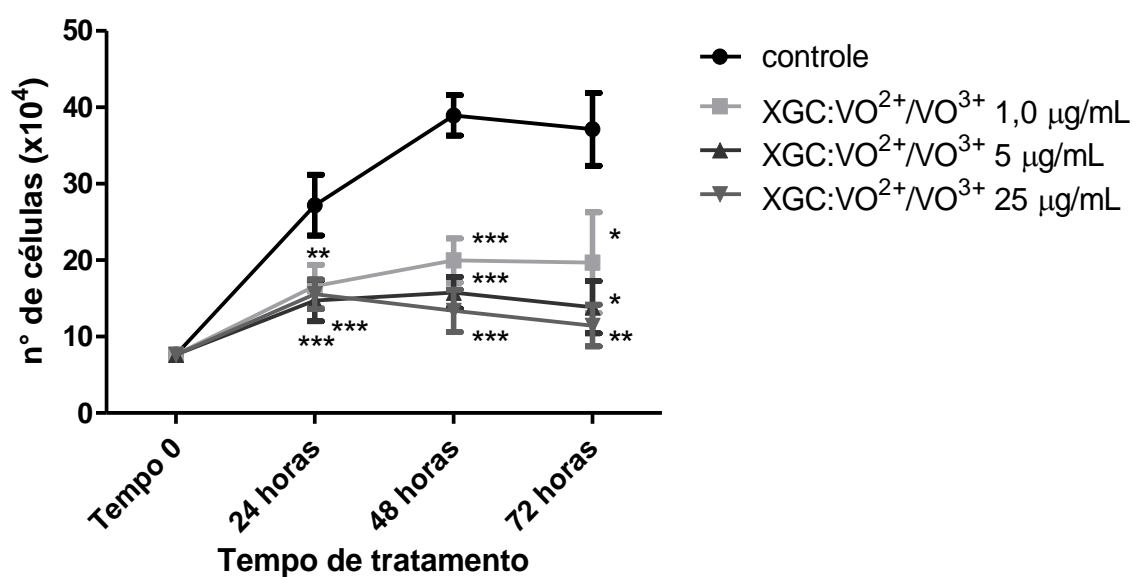


FIGURA 6: CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>.

FONTE: O autor (2012).

NOTA: A análise da proliferação celular foi realizada pelo método de exclusão do corante azul de Tripán conforme descrito em materiais e métodos (item 4.4.2). A) Células tratadas com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25 µg/mL e B) células tratadas com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> ambos nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O grupo controle representa células tratadas com meio de cultura. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

Ensaio de viabilidade e proliferação celular têm sido muito utilizados, a fim de identificar polissacarídeos que possam inibir o crescimento tumoral. Polissacarídeos isolados do cogumelo *Phellinus gilvus* inibiram a proliferação de células de melanoma *in vitro* (B16F10) de maneira dose dependente após tratamento com concentrações de 18 a 300 µg/mL por 48 horas. Quando estas células foram inoculadas em animais, o tratamento com este polissacarídeo foi capaz de reduzir o crescimento tumoral *in vivo* em ~53% (BAE *et al.*, 2005). Ainda em células de melanoma, polissacarídeos sulfatados, extraídos das algas marrons *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida*, reduziram em ~20 e 40% a proliferação de células SK-MEL-28, respectivamente, após o tratamento com 200 µg/mL e em torno de 60% para ambos, na concentração de 1 mg/mL, por 48 horas (VISHCHUK *et al.*, 2011).

Em outras linhagens celulares, foi visto que um polissacarídeo extraído do cogumelo *Maitake*, constituído principalmente de β-glucanas, reduziu a proliferação de células de câncer de mama, MCF-7 (MARTIN *et al.*, 2010). Polissacarídeos de *Angelica sinensis* reduziram a proliferação de células HeLa em concentrações de 3 a 100 µg/mL, de maneira dose dependente (CAO *et al.*, 2006). Outro estudo, avaliando o efeito de polissacarídeos sulfatados de 11 espécies de algas marinhas, coletadas no nordeste brasileiro, demonstrou que todas elas foram capazes de inibir a proliferação de células HeLa, em concentrações de 0,01 a 2 mg/mL (COSTA *et al.*, 2010). Por outro lado, um estudo utilizando xiloglucana de Jatobá demonstrou que este polissacarídeo estimulou a proliferação de células HeLa, em concentrações de 25, 100 e 200 µg/mL pelos tempos de 24 e 48 horas de exposição (SILVEIRA, 2010). De maneira semelhante, NOLETO e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento com uma galactomanana de *M. scabrella*, também provocou um leve aumento na proliferação de células HeLa. No entanto, este efeito foi revertido quando esta galactomanana foi complexada com oxovanádio (IV/V), apresentando uma inibição em torno de 60% na proliferação celular após 48 horas de tratamento.

No presente estudo, observou-se que o complexo de xiloglucana com oxovanádio (IV/V) também apresenta importante efeito antiproliferativo. Neste contexto, GONÇALVES e colaboradores (2011) demonstraram inibição da proliferação de células de carcinoma de tireóide tratadas com ortovanadato, na concentração de 10 µM. Ainda, MOLINUEVO e colaboradores (2004), demonstraram que o complexo de vanádio (IV) com glucose e naproxeno, reduziram a proliferação

de células de osteosarcoma. Por outro lado, BARRIO e colaboradores (2006) avaliando o efeito de complexo de vanadil com monossacarídeos em células de osteosarcoma, demonstraram que o complexo estimulou a proliferação celular. Os estudos realizados com diferentes compostos de vanádio sugerem que os efeitos destes dependem de alguns fatores, como o tipo celular, a concentração utilizada e o tipo de ligante associado ao metal.

### 5.3 EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE O CICLO CELULAR

Com base nos resultados obtidos previamente, optou-se por realizar ensaios para verificar se o polissacarídeo e seu complexo com vanádio exerceriam alguma interferência nas fases do ciclo celular.

A avaliação do ciclo celular no câncer possui uma grande importância para avaliar a resposta em fases específicas do ciclo, frente a determinados agentes terapêuticos (WILLIAMS; STOEBER, 2012). A análise por citometria de fluxo é uma maneira rápida e precisa de avaliar o conteúdo de DNA nas células, tornando-se assim, o instrumento de escolha para esta avaliação (DARZYNKIEWICZ, 2011). Este tipo de análise fornece informações sobre a posição da célula nas fases do ciclo celular, além de permitir uma estimativa da frequência daquelas que se encontram em morte celular, que se caracterizam pelo conteúdo de DNA fragmentado. A técnica baseia-se na capacidade do iodeto de propídio, um intercalante de DNA, emitir fluorescência que pode ser quantificada pelo aparelho de citometria (DARZYNKIEWICZ, 2010). Desta forma, é possível separar as fases do ciclo celular, conforme demonstrado nos histogramas representativos das figuras 7 e 9, em que M1 representam as células na fase sub-G1, ou seja, com conteúdo de DNA fragmentado; M2 células em fase G1; M3 células na fase S e, por fim, M4 que são células na fase G2/M.

Para este ensaio, as células foram tratadas com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL, ambos em um tempo de 24 horas, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (item 4.4.3). Os histogramas representativos das células tratadas com XGC estão

ilustrados na figura 7. O tratamento com a xiloglucana de Copaíba, não foi capaz de provocar mudanças na progressão do ciclo celular das células de melanoma, nestas condições experimentais, conforme demonstrado na figura 8.

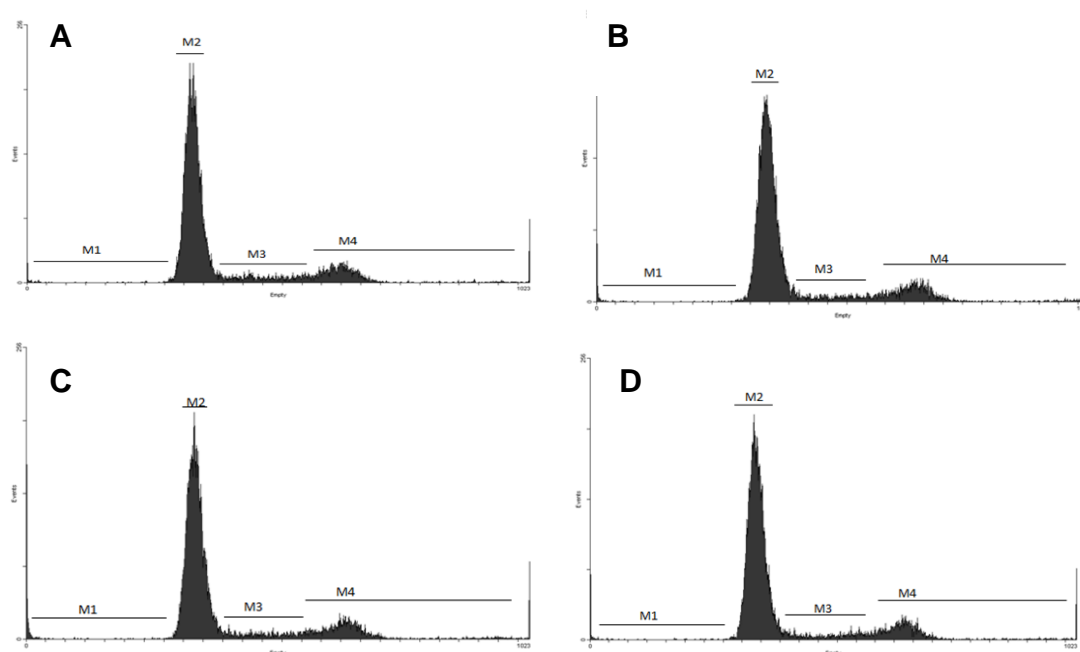


FIGURA 7: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM XGC.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Histogramas representativos de células B16F10 tratadas com xiloglucana pelo período de 24 horas. A) condição controle (ausência do polissacarídeo); B) Células tratadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de XGC; C) Células tratadas com 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e D) Células tratadas com 200  $\mu\text{g/mL}$  de XGC. As regiões delimitadas nos histogramas correspondem a: M1 - fase sub-G1; M2 - fase G1, M3 - fase S e M4 - fase G2-M.

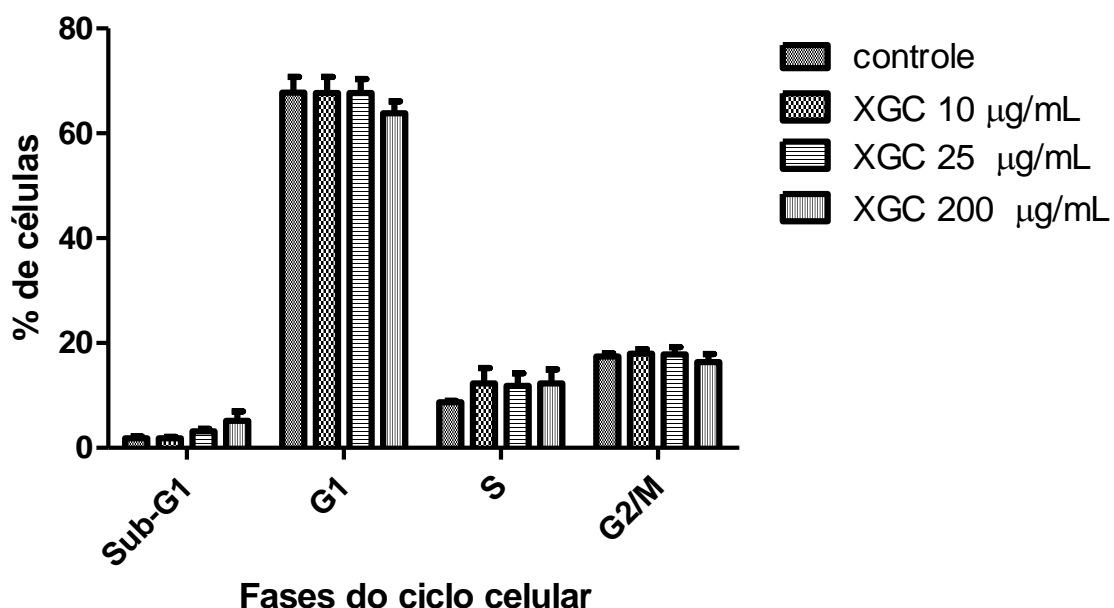


FIGURA 8: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM XGC.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Análise do ciclo celular de células B16F10 após tratamento com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em duplicata.  $p > 0,05$ .

Ao contrário deste estudo, alguns autores demonstraram que diferentes polissacarídeos são capazes de afetar a progressão do ciclo celular em linhagens tumorais. Polissacarídeo isolado de *Zyphus jujuba*, provocou uma diminuição de células de melanoma na fase G1, com concomitante aumento na fase G2/M (HUNG *et al.*, 2012). Em células de hepatocarcinoma, o tratamento com polissacarídeo de *M. anguillicauttatus* por 5 dias e na concentração de 400 µg/mL, provocou um aumento na fase sub-G1 do ciclo celular, indicando morte celular. Ainda, foi demonstrado que polissacarídeos de sementes de *Ginkgo biloba* provocam uma diminuição no número de células na fase G2/M2, indicando um efeito antiproliferativo (CHEN *et al.*, 2002).

Para a avaliação do efeito do complexo de xiloglucana com oxovanádio sobre a progressão do ciclo celular, as células foram tratadas com concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, pelo tempo de 24 horas. Os histogramas representativos de cada grupo avaliado estão demonstrados abaixo (figura 9).

Da mesma maneira que o tratamento com XGC, o complexo  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  também não provocou alteração no ciclo celular das células B16F10. Em relação ao controle, observa-se distribuição semelhante de células em cada fase do ciclo (figura 10).

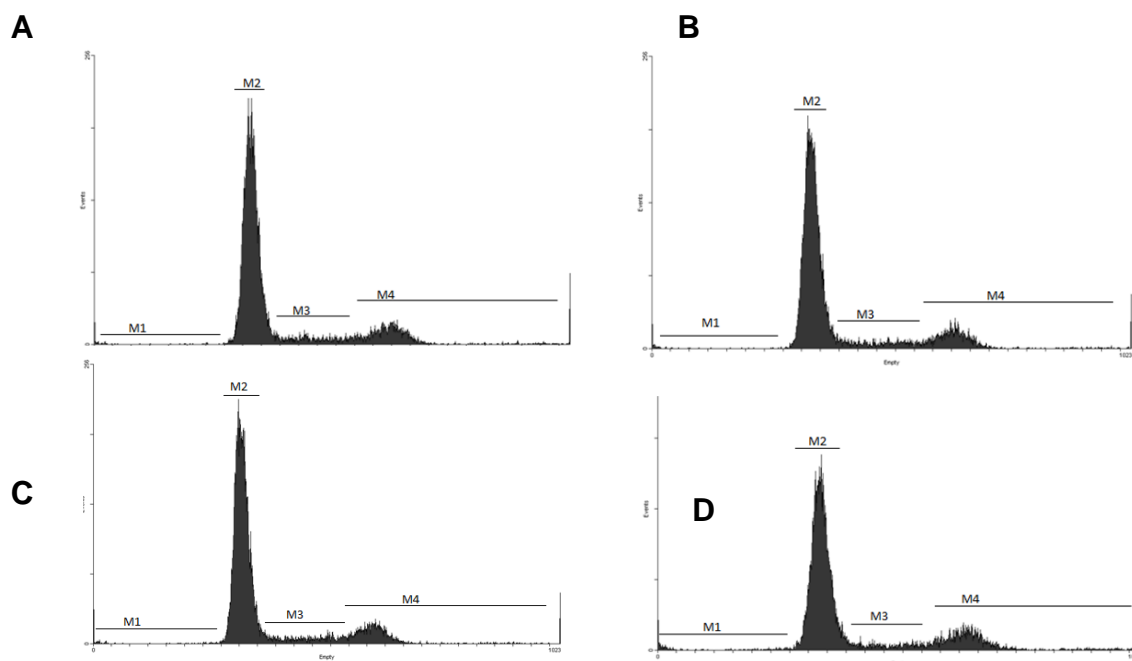


FIGURA 9: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ .

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Histogramas representativos de células B16F10 tratadas com  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  pelo período de 24 horas. A) condição controle (ausência do complexo); B) Células tratadas com 5  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ ; C) Células tratadas com 25  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  e D) Células tratadas com 200  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ . As regiões delimitadas nos histogramas correspondem a: M1 - fase sub-G1; M2 - fase G1, M3 - fase S e M4 - fase G2-M.



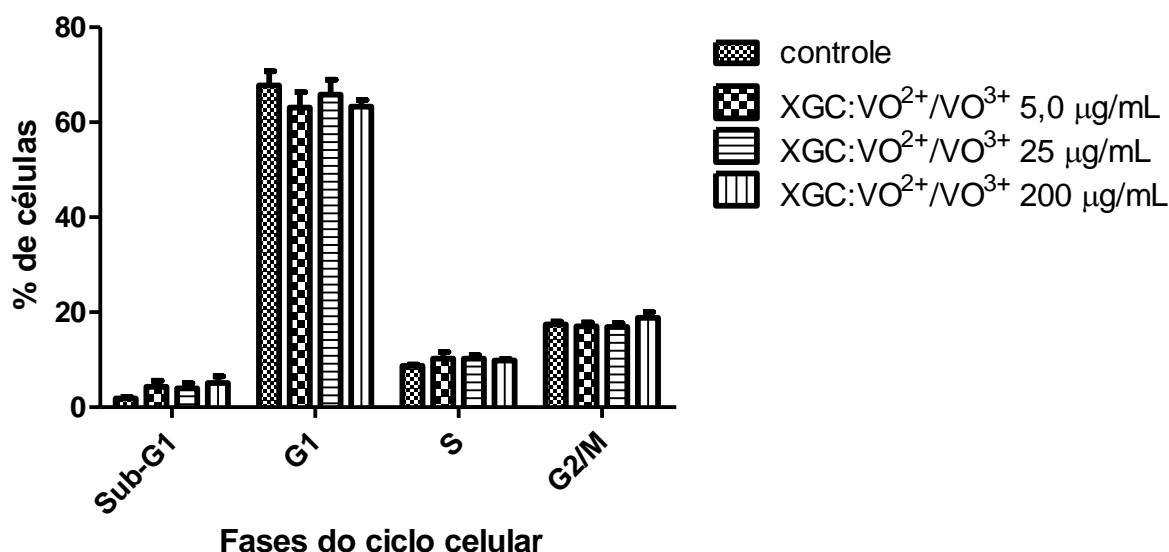


FIGURA 10: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Análise do ciclo celular de células B16F10 após tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL por 24 horas. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata.  $p > 0,05$ .

Em relação aos efeitos do vanádio sobre a progressão do ciclo celular poucos estudos são descritos na literatura. RAY e colaboradores (2006), demonstraram que o vanádio foi capaz de aumentar o número de células de câncer de mama na fase sub-G1 e diminuir o número de células na fase G1, indicando um efeito citotóxico. No entanto, estes resultados foram obtidos com a utilização de altas concentrações de vanádio, variando de 100 a 200 µM. MESHKINI e colaboradores (2010), em estudo conduzido em células de leucemia, demonstraram que o tratamento com 13 µM com vanádio provocou um aumento de células na fase G2/M do ciclo celular. O tratamento com 10 µM de ortovanadato em células de carcinoma de tireóide foi capaz de reduzir o número de células da fase G1 e aumentar o número de células na fase sub-G1. Em concentrações inferiores a 10 µM, o perfil do ciclo celular foi semelhante às células na condição controle, ou seja, sem a adição do composto (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo demonstram que, embora ocorra uma pronunciada redução na viabilidade (figura 5) e na proliferação celular (figura 6), o tratamento com XGC e seu complexo com oxovanádio não são capazes de influenciar a progressão do ciclo celular nestas condições experimentais.

#### 5.4 EFEITOS DE XGC E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR

Na busca de elucidar os eventos que propiciaram a citotoxicidade de XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, realizou-se o estudo de morfologia celular. Esta avaliação fornece indícios do tipo de morte celular, uma vez que as vias da apoptose e necrose são definidos por critérios morfológicos distintos. A análise morfológica de uma célula em apoptose revela uma membrana plasmática íntegra, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de pequenas vesículas ao redor da membrana, conhecidos como "corpos apoptóticos". Por outro lado, a necrose é caracterizada por um aumento de volume citoplasmático que leva a perda da integridade da membrana plasmática (RICCI; ZONG, 2006; MCKERNAN *et al.*, 2009). Os resultados de tais avaliações estão representados nas figuras 11 e 12.

Na figura 11 estão demonstradas micrografias representativas das células tratadas com XGC nas concentrações de 2,5; 10; 25 e 200 µg/mL pelo tempo de 24 horas. No grupo controle observa-se uma monocamada contínua, com as células justapostas, núcleo grande e extensos filamentos celulares, como é característico desta linhagem. Não foram observadas diferenças morfológicas quando as células foram tratadas com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25 µg/mL. Quando as células foram tratadas com 200 µg/mL de XGC (figura 11D), observa-se uma redução no número de células aderidas à lamínula e discretas alterações na morfologia celular, evidenciadas por uma diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos.

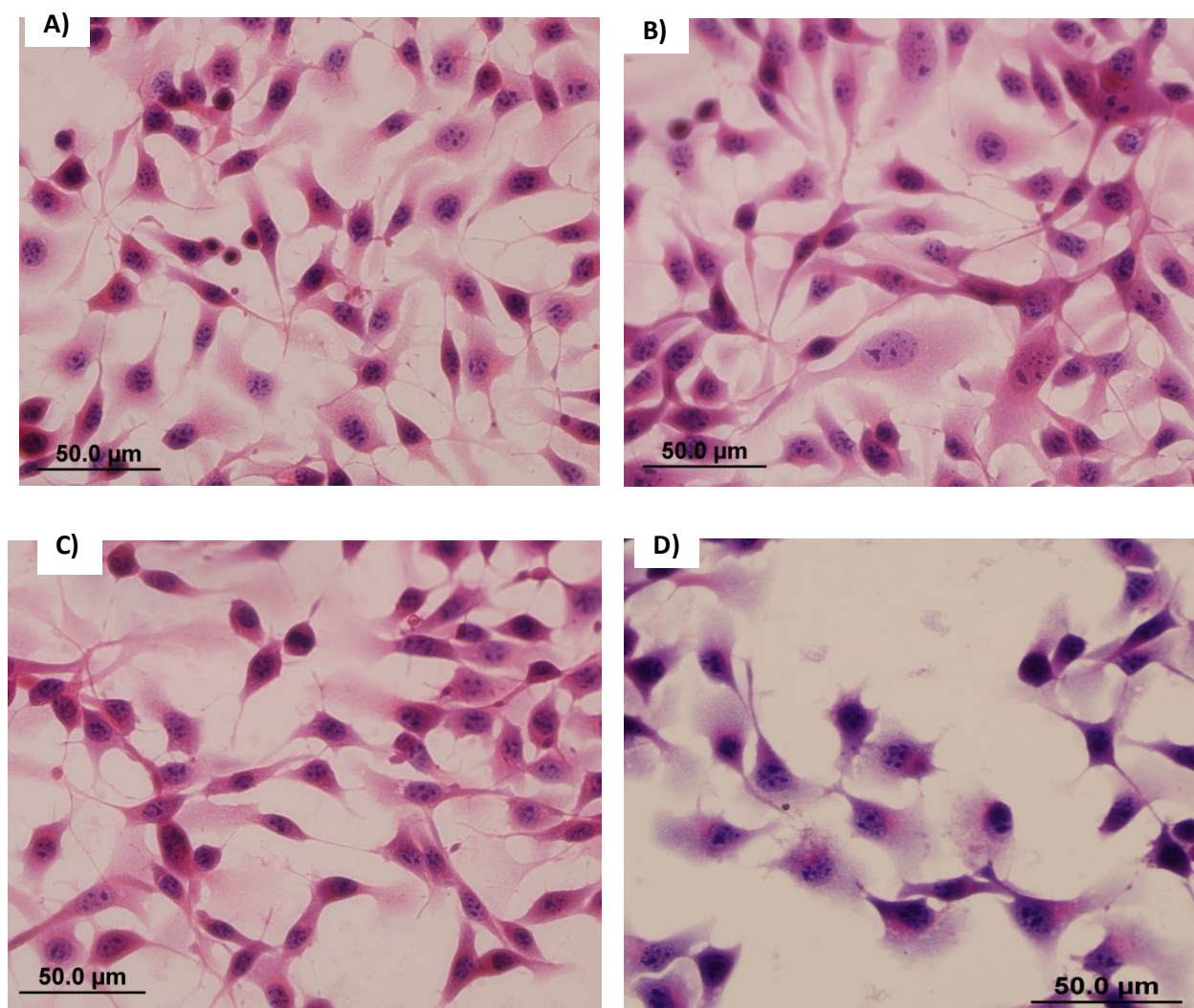


FIGURA 11: EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16F10

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A morfologia celular foi avaliada pela coloração com hematoxilina e eosina conforme descrito em materiais e métodos (item 4.4.4.1). A) células controle (ausência do polissacarídeo); B) células tratadas com 10 µg/mL de XGC; C) células tratadas com 25 µg/mL e D) células tratadas com 200 µg/mL. Aumento de 400x.

A figura 12 apresenta as micrografias representativas das células tratadas com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL pelo tempo de 24 horas. Observa-se que em concentrações inferiores a 200 µg/mL, não ocorre alterações morfológicas quando as células são tratadas com o complexo. Na concentração de 200 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> (figura 12D), observa-se alterações discretas na morfologia celular, da mesma maneira que o tratamento com XGC, ou seja, uma diminuição do número de células aderidas, evidenciando assim, o efeito

antiproliferativo deste composto e, uma redução nas projeções celulares, fazendo com que as células se aproximem entre si.

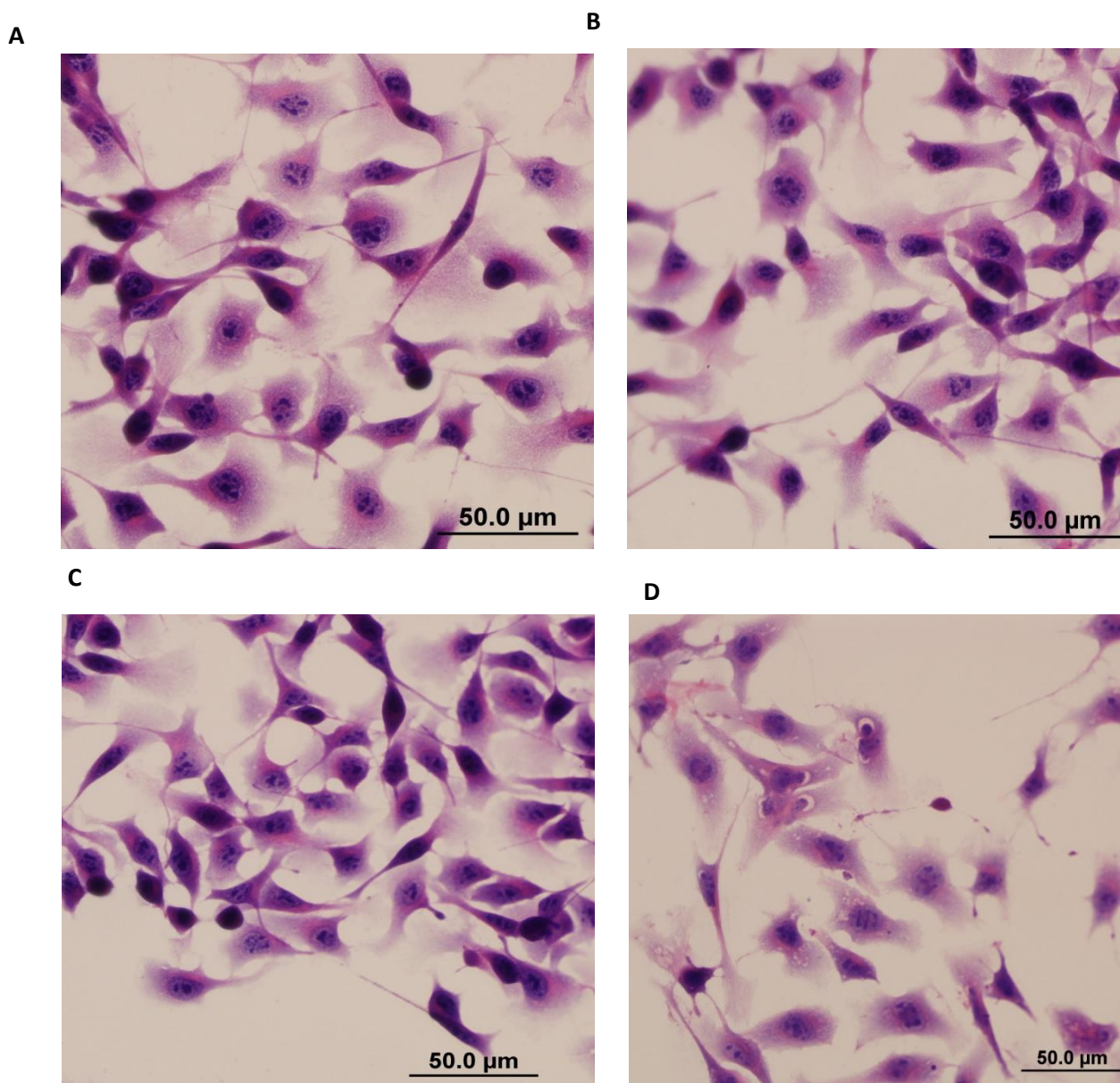


FIGURA 12: EFEITOS DO TRATAMENTO COM  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16F10

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A morfologia celular foi avaliada pela coloração com hematoxilina e eosina conforme descrito em materiais e métodos (item 4.6.4.1). A) células controle (ausência do complexo); B) células tratadas com 5  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ ; C) células tratadas com 25  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  e D) células tratadas com 200  $\mu\text{g/mL}$   $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ . Aumento de 400x.

MORETÃO e colaboradores (2004), em estudo avaliando os efeitos de um heteropolissacarídeo ácido extraído de *Anadenanthera colubrina*, contendo principalmente galactose e arabinose, denominado ARAGAL, em células B16F10, verificaram que o tratamento com concentrações inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  não foi

capaz de provocar mudanças morfológicas nestas células. No entanto, o tratamento com 200 e 300 µg/mL deste polissacarídeo alterou morfológicamente as células, caracterizadas pela presença de projeções celulares longas e filiformes e a formação de *blebs*. Da mesma maneira que no nosso trabalho, a avaliação das células tratadas com 200 µg/mL de ARAGAL revelam um menor número de células aderidas à lamínula, indicando o efeito inibidor da proliferação celular. Este mesmo polissacarídeo avaliado em células HeLa, provocou intensa condensação celular e presença de *blebs* mesmo em baixas concentrações (25 e 50 µg/mL) (SILVEIRA, 2010). Ainda em células HeLa, foi demonstrado que o tratamento com xiloglucana de Jatobá, na concentração de 200 µg/mL por 48 horas, provoca um condensamento celular e do núcleo. Da mesma maneira que no nosso trabalho, concentrações inferiores a 200 µg/mL não provocaram diferenças morfológicas significativas (SILVEIRA, 2010).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO

### 5.5.1 Marcação com Anexina V-FITC/PI

Embora não tenham sido observadas grandes alterações morfológicas nas células B16F10 após tratamento com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, não se exclui a possibilidade destes compostos induzirem morte destas células, especialmente em altas concentrações, visto que na concentração de 200 µg/mL, tanto de XGC quanto de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, leves alterações no perfil celular foram observadas.

Para avaliar uma possível indução de morte pela xiloglucana e seu complexo, células B16F10 foram tratadas com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL e com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL, pelo tempo de 24 horas nos dois casos. Após tratamento, as células foram processadas e avaliadas em citômetro de fluxo utilizando a dupla marcação com Anexina V-FITC/PI, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 4.4.5.2). A anexina tem sido amplamente empregada em citometria de fluxo para a avaliação de morte celular, uma vez que



ela apresenta alta capacidade de se ligar a fosfolípídeos, em especial a fosfatidilserina, de uma maneira cálcio dependente. A fosfatidilserina se localiza na parte interna da membrana plasmática e é rapidamente externalizada em resposta a aumentos do cálcio intracelular, injúria celular ou indução de apoptose. Esta externalização ocorre relativamente cedo no processo de apoptose celular e serve como reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos, para sua posterior remoção (BRUMATTI *et al.*, 2008; LOGUE *et al.*, 2009).

A figura 13 mostra os *dot-plots* representativos das células tratadas com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>. Células nos estágios iniciais de apoptose estão localizados no quadrante inferior direito do dot-plot (D), como positivo para a marcação com anexina V-FITC, uma vez que nesta etapa as membranas celulares ainda encontram-se intactas, não permitindo a entrada de PI. Nos estágios finais da apoptose, o PI entra na célula levando a uma dupla marcação com anexina V-FITC/PI (B). Células necróticas aparecem no quadrante superior esquerdo, com a marcação apenas para PI (A) e células viáveis são demonstradas no quadrante C (LOGUE *et al.*, 2009).

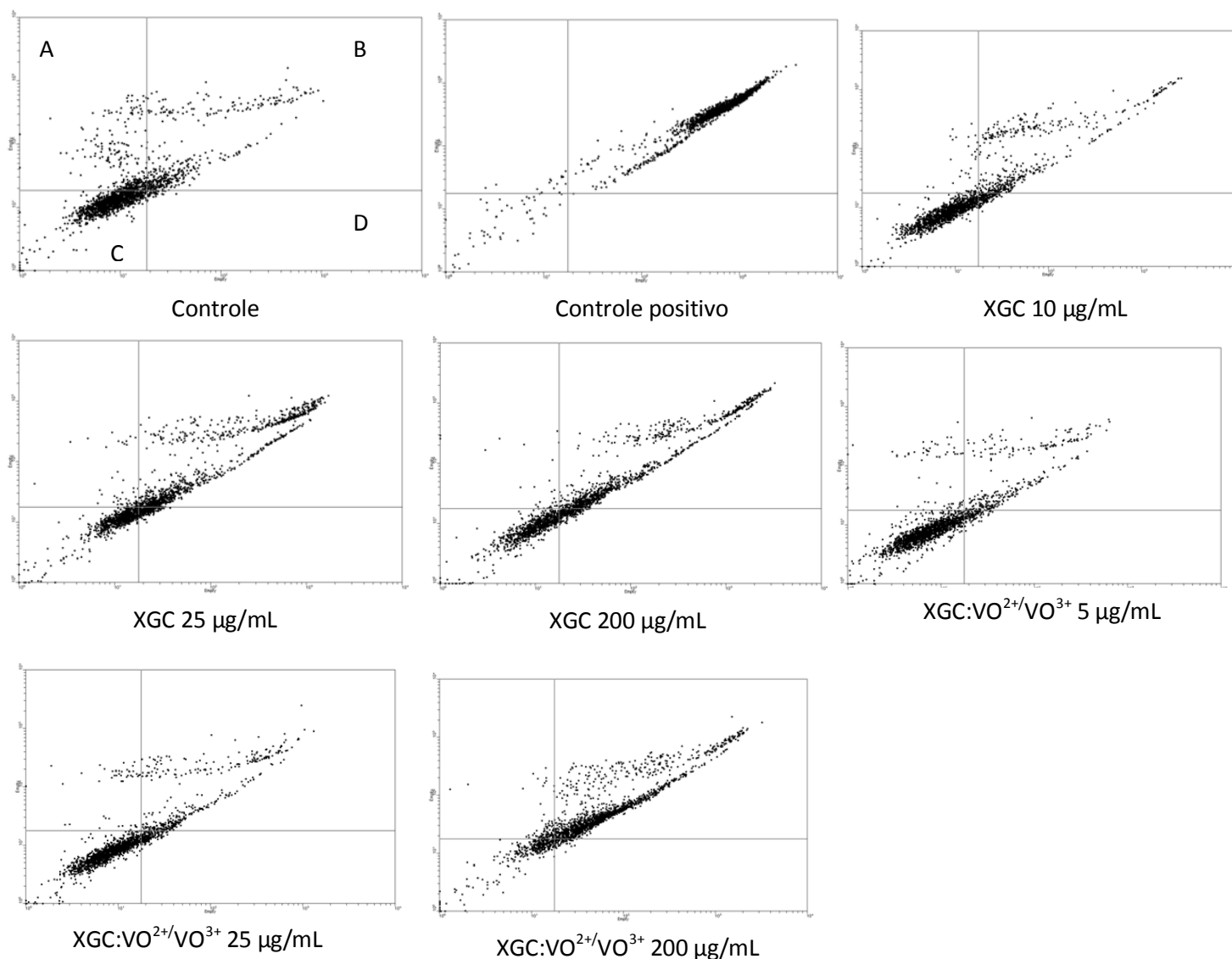


FIGURA 13: DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DA AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Dot-plots representativos da dupla marcação com anexina V-FITC/PI. Controle representa o grupo tratado apenas com meio de cultura. Controle positivo representa o grupo tratado com arsenito de sódio 5  $\mu$ M e menadiona 20  $\mu$ M. Os grupos de tratamento são compostos por: XGC 10, 25 e 200  $\mu$ g/mL por 24 horas e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 5, 25 e 200  $\mu$ g/mL por 24 horas. O eixo y representa a fluorescência emitida pelo PI e o eixo X a fluorescência emitida pela anexina V-FITC. A) células necróticas, B e D) células apoptóticas e C) células viáveis.

Além das células receberem o tratamento com XGC ou XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, como descrito anteriormente, realizou-se também o tratamento com menadiona 20  $\mu$ M e arsenito de sódio 5  $\mu$ M por 24 horas, como controle positivo para apoptose (ALIPRANDINI, 2010 adaptado). Conforme demonstrado na figura 14 o tratamento com a xiloglucana nativa nas concentrações de 10, 25 e 200  $\mu$ g/mL não foi capaz de

induzir morte celular, tanto por necrose, quanto por apoptose, nestas condições experimentais.

Para o tratamento com o complexo da xiloglucana com o vanádio, observa-se que o tratamento com as concentrações de 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  pelo tempo de 24 horas não provocou morte nas células B16F10 (figura 15). No entanto, quando as células foram tratadas com concentrações maiores do complexo, ou seja, 200  $\mu\text{g/mL}$ , ocorreu um aumento significativo de células positivas para apoptose, em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

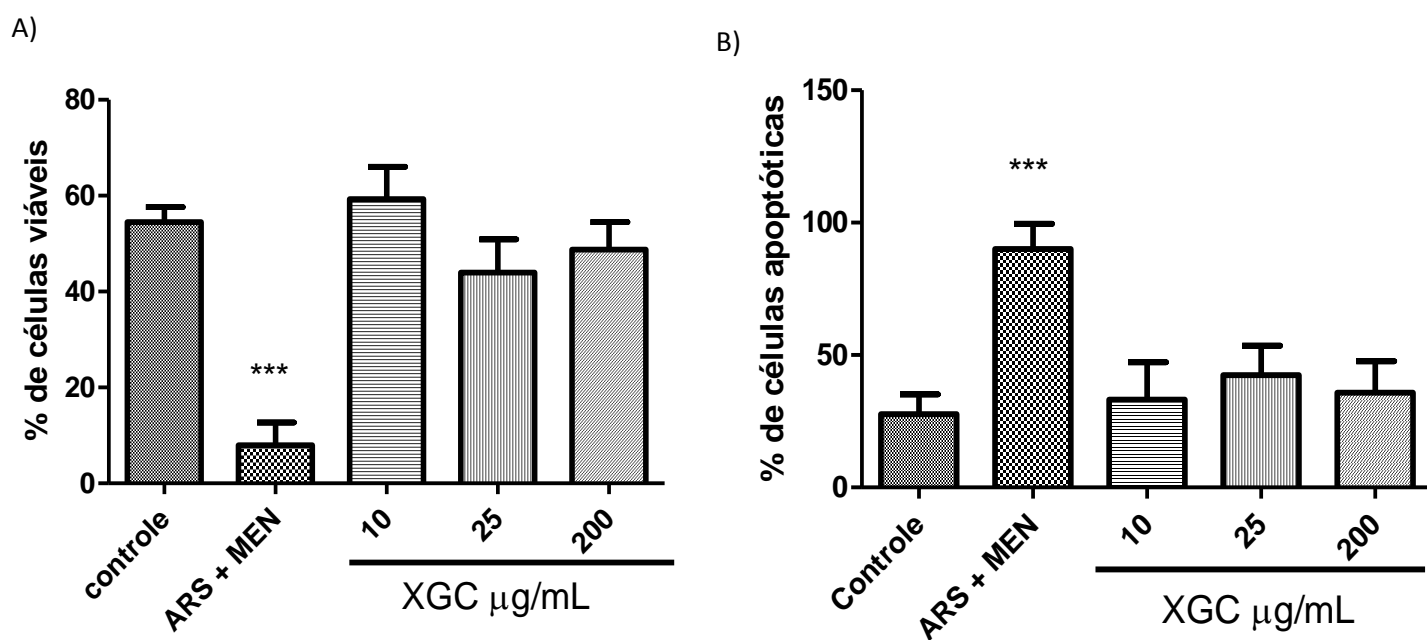


FIGURA 14: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 VIAVÉIS E APOPTÓTICAS TARDIAS APÓS TRATAMENTO COM XGC.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Porcentagens de células viáveis (A) e apoptóticas (B) analisadas após o tratamento de XGC nas concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas. O grupo controle representa as células tratadas apenas com o meio de cultura. As condições experimentais estão descritas no item materiais e métodos (item 4.6.5.2). Como controle positivo para apoptose foi utilizado o tratamento com arsenito de sódio 5  $\mu\text{M}$  + menadiona 20  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao controle.



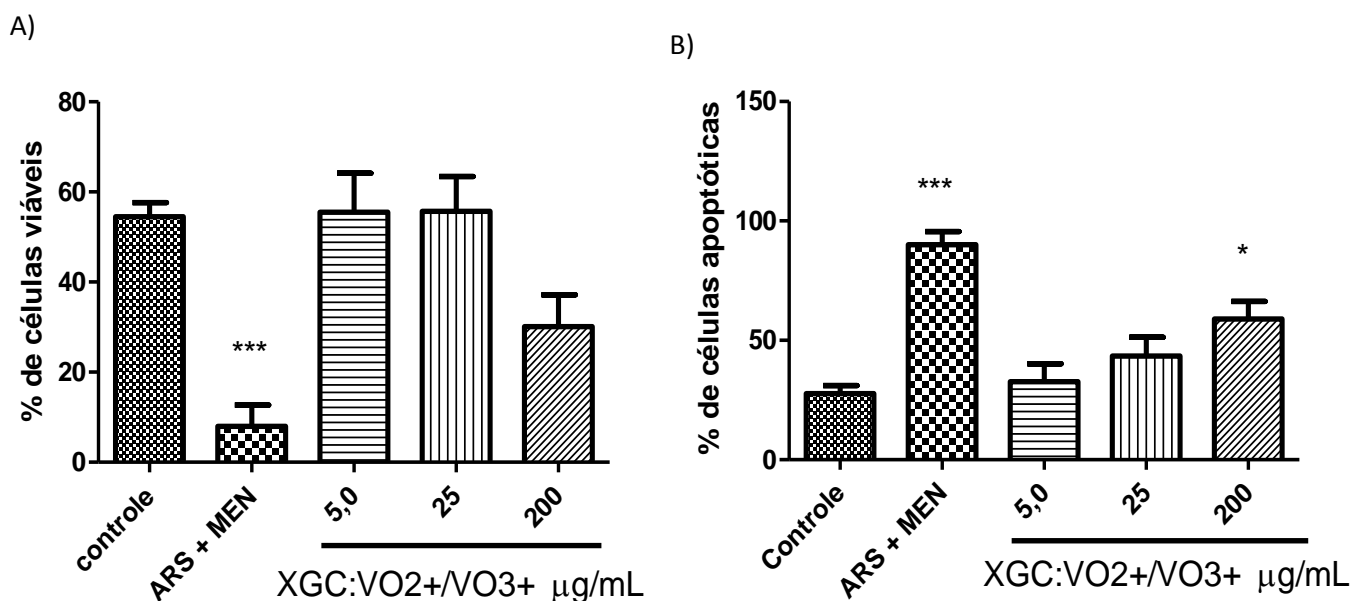


FIGURA 15: PORCENTAGENS DE CÉLULAS B16F10 VIAVÉIS E APOPTÓTICAS TARDIAS APÓS TRATAMENTO COM XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>  
 FONTE: O autor (2012)

NOTA: Porcentagens de células viáveis (A) e apoptóticas (B) analisadas após o tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5 µg/mL, 25 µg/mL e 200 µg/mL por 24 horas. O grupo controle representa as células tratadas apenas com o meio de cultura. As condições experimentais estão descritas no item materiais e métodos (item 4.4.5.2). Como controle positivo para apoptose foi utilizado o tratamento com arsenito de sódio 5 µM + menadiona 20 µM por 48 horas. Os resultados estão expressos como média±DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 comparado ao controle.

Diferentemente do resultado obtido no presente estudo, alguns autores demonstraram que polissacarídeos são capazes de induzir a morte de células de melanoma (B16F10). Polissacarídeo extraído do cogumelo *Phellinus gilvus*, foi capaz de induzir apoptose em células B16F10, na concentração de 75 µg/mL por 48 horas (BAE *et al.*, 2005). Uma ramnogalacturonana péctica, isolada do quiabo foi capaz de induzir apoptose em células B16F10, quando avaliada pelo ensaio de marcação da Anexina V-FITC (VAYSSADE *et al.*, 2010).

LI e colaboradores (2010), demonstraram que polissacarídeo isolado de maçãs vermelhas, composto principalmente de ácido galacturônico, glucose e galactose, foi capaz de induzir apoptose via dependente de caspases em linhagens de câncer coloretal (SW-1116, HT-29 e CACO-2). Martin e colaboradores (2010), demonstraram que β-glucanas isoladas de *Grifola frondosa* induziram apoptose em

células de câncer de mama (MCF-7). Em células de hepatoma (SMMC-7721), foi visto que polissacarídeos de sementes de *Ginkgo biloba* aumentam a taxa de apoptose destas células (CHEN *et al.*, 2002).

A adição de oxovanádio (IV) ao polissacarídeo foi capaz de induzir morte celular em concentrações mais elevadas do complexo, ou seja, 200 µg/mL (figura 17), demonstrando que a presença do metal exerce efeito importante na indução de morte celular. Estudos em diferentes linhagens celulares demonstram que o vanádio exerce seu papel antitumoral por meio da inibição de tirosina fosfatase e/ou ativação de tirosina fosforilase. Ambos efeitos ativam vias de transdução de sinal que conduzem para a apoptose. Além disso, compostos de vanádio podem induzir a fragmentação de DNA e lipoperoxidação da membrana plasmática e assim, conduzir para a morte celular. Algumas linhas de evidência indicam que a clivagem do DNA provocada pelo vanádio, seja devido ao aumento na formação de radicais livres de oxigênio, em especial, o radical hidroxila (EVANGELOUS, 2002).

Em estudo conduzido por GONÇALVES e colaboradores (2011), avaliando a indução de apoptose em células TCP-1 pelo ortovanadato, foi demonstrado que a utilização de 10 µM provocou apoptose nas células, em via dependente de caspases, envolvendo a via mitocondrial. ZHAO e colaboradores (2010) demonstraram que compostos de vanádio induziram a liberação de citocromo c em mitocôndrias isoladas, por meio da indução da abertura do poro de transição de permeabilidade.

Estudos dos mecanismos de indução de morte celular por complexos de vanádio com polissacarídeos não foram encontrados na literatura.

### 5.5.2 Liberação de citocromo c

Ainda na avaliação da indução de morte celular e, na tentativa de tentar elucidar se a morte celular provocada nas células B16F10 com o tratamento de 200 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> envolve a via mitocondrial, foi avaliado em seguida a liberação do citocromo c frente aos compostos em estudo.

O citocromo *c* está associado à cardiolipinas encontradas nas mitocôndrias (ORRENIUS, 2004). Uma vez liberado, ele induz a formação dos apoptossomos, contendo Apaf-1 (Apoptosis Protease-activating Factor-1), o iniciador pró-caspase 9 e o próprio citocromo *c*. Este complexo leva à clivagem de pró-caspase 9 e inicia a cascata de caspases efetoras 3 e 7 (MARTINVALET *et al.*, 2005). Ainda, a liberação de citocromo *c* provoca vagarosa e irreversível perda da função mitocondrial e decréscimo da respiração (LISTON *et al.*, 2003). No que diz respeito ao câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. Sendo assim, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia (GRIVICICH *et al.*, 2007; BROHEM *et al.*, 2009).

Para avaliar a liberação de citocromo *c*, as células foram tratadas com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 25 e 200 µg/mL pelo tempo de 24 horas. Além dos compostos em estudo, foi utilizado o tratamento com o flavonóide quercetina na concentração de 300 µM por 24 horas, como controle positivo da liberação de citocromo *c* (ALIPRANDINI, 2010). Os resultados obtidos para o tratamento com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, estão demonstrados na figura 16 (A e B, respectivamente). Tanto para a forma nativa da xiloglucana, quanto para a forma complexada com vanádio, não foi observado liberação de citocromo *c* após o tratamento, em relação ao controle. Demonstrando assim, que estes compostos não são capazes de induzir apoptose via mitocondrial nestas condições experimentais.

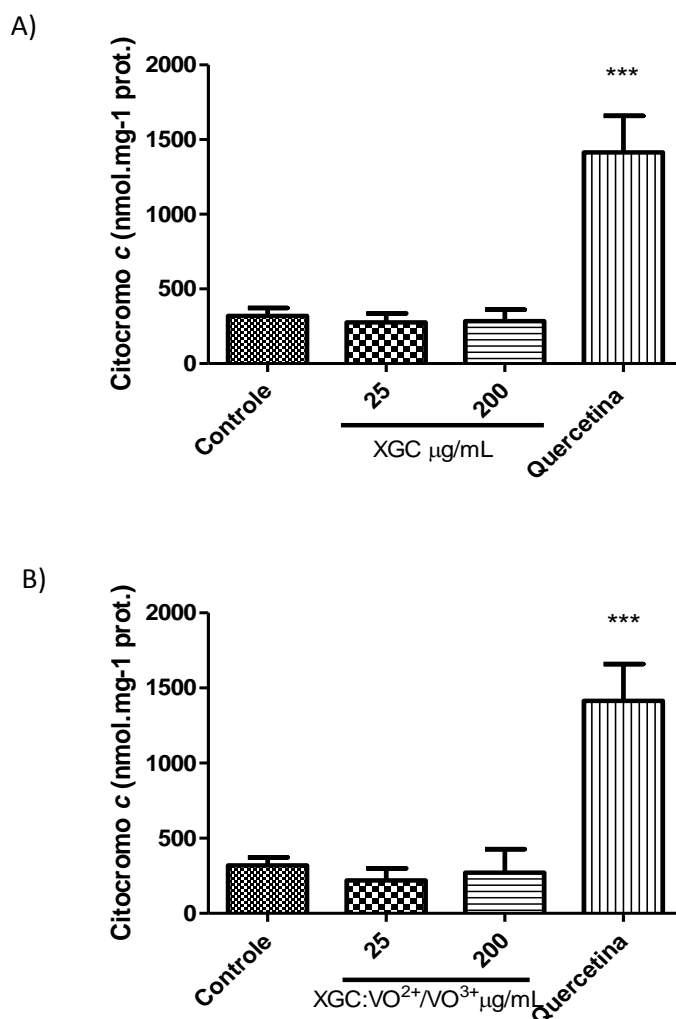


FIGURA 16: EFEITO DE XGC E SEU COMPLEXO XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: As condições experimentais estão descritas da seção de materiais e métodos (item 4.4.5.1). A liberação de citocromo c foi avaliada espectrofotometricamente a 414 nm, após 24 horas de tratamento. A) liberação de citocromo c após tratamento com XGC nas concentrações de 25 e 200 µg/mL e B) liberação de citocromo c após tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 25 e 200 µg/mL. Como controle positivo para a indução de citocromo c foi utilizado o flavonóide quercetina na concentração de 300 µg/mL por 24 horas. Os resultados estão expressos como média±DP de três experimentos independentes realizados em duplicatas. \*\*\* p < 0,001.

## 5.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO DE CÉLULAS B16F10

### 5.6.1 Avaliação do consumo de oxigênio

A fim de verificar se o tratamento com a xiloglucana e seu complexo com oxovanádio afetam o metabolismo das células B16F10, foram analisados alguns estados da respiração destas células

A utilização do oxigênio pelas células tumorais é importante para avaliar a resposta do tumor frente a vários tipos de tratamento antitumorais (BRAUN; BEATTY, 2007). Uma vez que as mitocôndrias exercem papel central no fornecimento de energia para as células eucarióticas, mantendo sua sobrevivência e, também participando dos processos de morte celular, elas têm sido consideradas importantes alvos terapêuticos no estudo de compostos bioativos (WALLACE & STARKOV, 2000; OTT *et al.*, 2007; ROMERO-GRACIA *et al.*, 2011).

Para estes ensaios, as células foram tratadas com baixas concentrações dos compostos, sendo 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC e 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> ambos pelo tempo de 24 horas. Após o tempo de tratamento, a suspensão celular foi coletada e a respiração avaliada em oxígrafo. Foi realizada a análise com as células intactas e na ausência de substratos exógenos. A velocidade do consumo de oxigênio foi determinada na presença ou ausência de inibidores da cadeia de transporte de elétrons e do desacoplador FCCP e os estados da respiração foram acompanhados graficamente, sendo eles:

1) Estado basal: estado da respiração logo após a adição da suspensão celular ao oxígrafo, na ausência de inibidores e desacopladores;

2) Estado Leak: representa o consumo de oxigênio após a adição de oligomicina que se liga ao componente OSCP (*oligomycin sensitivity conferring protein*) do complexo F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase, bloqueando a entrada de prótons para a matriz mitocondrial e, conseqüentemente diminuindo o consumo de oxigênio;

3) Estado desacoplado: reflete o consumo de oxigênio após a adição do desacoplador FCCP. Nesta etapa a síntese de ATP está desacoplada do transporte de elétrons através da cadeia respiratória, o que resulta no aumento da respiração.

4) Estado inibido: é o estado do consumo de oxigênio após a adição dos inibidores rotenona e antimicina, que bloqueiam o complexo I e III da cadeia de transporte de elétrons, respectivamente.

A figura 17 ilustra um traçado representativo da análise de consumo de oxigênio. No traçado estão demonstrados o fluxo de oxigênio (linha vermelha), a concentração de oxigênio no meio (linha azul) e os quatro estados da respiração

citados anteriormente, após a adição dos inibidores ou desacopladores. É importante ressaltar que os estados Basal, Leak e Desacoplado foram obtidos após a subtração da respiração verificada na presença de antimicina e rotenona. Esta subtração é necessária para que se represente o consumo de oxigênio restrito à respiração mitocondrial.

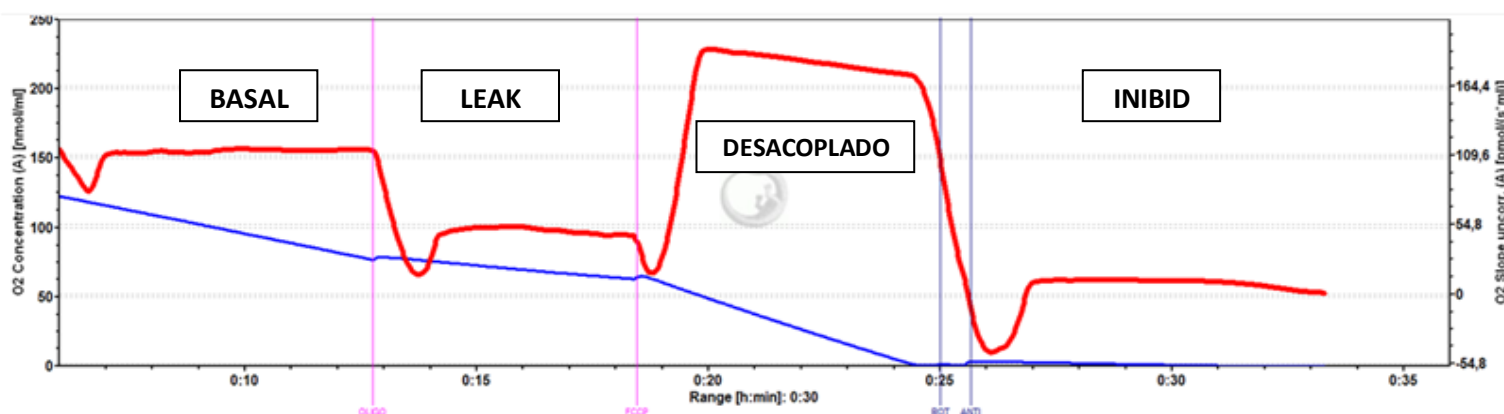


FIGURA 17: TRAÇADO REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012).

NOTA: A análise da respiração celular foi realizada conforme metodologia descrita do Item 4.4.6.1. O traçado ilustra a concentração de oxigênio (linha azul), o fluxo de oxigênio (linha vermelha), a adição de inibidores e desacoplador, bem como os estados da respiração (basal, leak, desacoplado e inibido). O traçado é referente a uma análise do grupo controle (ausência de tratamento). OLIGO: oligomicina, ROT: rotenona e ANTI: antimicina.

A figura 18 demonstra a análise quantitativa do consumo de oxigênio em cada estado da respiração, pelas células B16F10 após o tratamento com a xiloglucana nativa. Observa-se que a presença do polissacarídeo provocou um aumento no consumo de oxigênio pelas células, nos três estados da respiração avaliados. O resultado obtido parece estar relacionado a uma concentração ideal do polissacarídeo, especialmente nos estados leak e desacoplado, uma vez que em baixas concentrações de XGC (2,5 µg/mL) não se observa alteração no consumo de oxigênio e, após o tratamento com concentrações mais elevadas (25 µg/mL) o consumo de oxigênio retorna a um perfil semelhante ao grupo controle. Já a concentração intermediária de 10 µg/mL de XGC, provocou um aumento de ~64%

no consumo de oxigênio no estado leak e um aumento mais pronunciado no estado desacoplado (132%), em relação ao controle, sugerindo que a presença do polissacarídeo de alguma forma, potencializa o efeito desacoplador do FCCP.

Os resultados indicam que o polissacarídeo na sua forma nativa exerce um papel semelhante a um desacoplador, ou seja, aumenta o consumo de oxigênio a um nível máximo e, a adição de concentrações mais elevadas do polissacarídeo provoca uma diminuição na velocidade de consumo de oxigênio. Uma vez que o estudo foi realizado com as células intactas, ou seja, sem serem permeabilizadas, sugere-se que de alguma maneira o polissacarídeo consiga por si só, interfere na fluidez da membrana mitocondrial. No entanto, para afirmar que o polissacarídeo seja capaz de atravessar a membrana seria necessário estudos adicionais. PÉTERSZEGLI *et al.*, (2003) demonstraram através de marcação do polissacarídeo (nanopartículas) com isotiocianato de fluoresceína (FITC) que o polímero possui dois sítios de interação com os fibroblastos, a membrana plasmática e o núcleo. Desta forma, estes autores mostraram que o polissacarídeo penetrou nas células.

SILVEIRA (2010), em estudo sobre os efeitos de xiloglucana de Jatobá em células HeLa, observou que o tratamento de células intactas não foi capaz de alterar o consumo de oxigênio destas células, indicando que esta xiloglucana e também, neste tipo celular, o polissacarídeo só consegue exercer algum efeito quando as células são previamente permeabilizadas. Após as células serem permeabilizadas com digitonina, a autora demonstra que a xiloglucana em altas concentrações (200 µg/mL) foi capaz de inibir o consumo de oxigênio, resultado oposto ao encontrado no presente trabalho, evidenciando que a atividade de polissacarídeos sobre o consumo de oxigênio depende da estrutura do polissacarídeo, bem como do tipo celular.

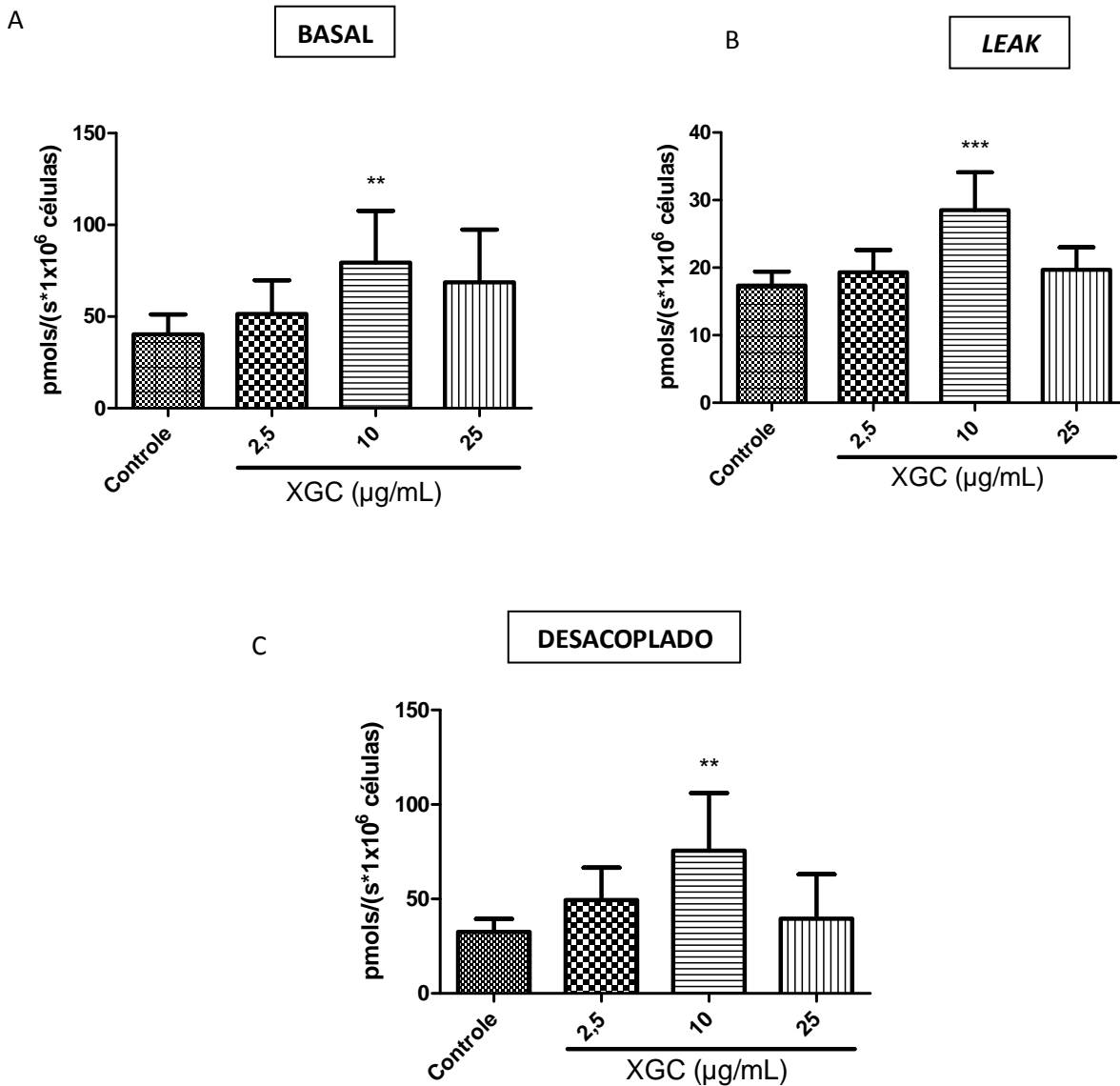


FIGURA 18: EFEITO DE XGC SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A determinação do consumo de oxigênio foi realizada conforme descrito na seção de materiais e métodos (Item 4.6.6.1). A) estado basal da respiração, B) estado leak e C) estado desacoplado. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. O grupo controle representa as células tratadas somente com meio de cultura.

Os resultados obtidos para as células tratadas com XGC:VO<sup>2+/3+</sup> estão ilustrados na figura 19. Ao contrário do efeito provocado pela xiloglucana na sua forma nativa, o tratamento com o complexo resultou em uma importante redução no consumo de oxigênio pelas células B16F10. No estado basal observa-se uma redução de ~43% e 54% no consumo de oxigênio, para as células tratadas com a concentração de 5 e 25 µg/mL, respectivamente. Já no estado desacoplado o complexo provocou uma redução de ~60% e ~67% no consumo de oxigênio nas



concentrações de 5 e 25 µg/mL, respectivamente, em relação ao controle. Ainda em relação aos efeitos do complexo sobre o consumo de oxigênio das células B16F10, parece que este não é dependente da concentração e, ao contrário do observado para as células tratadas com a xiloglucana, o metal, presente já em baixas concentrações é capaz de provocar alterações no consumo de oxigênio destas células.

A mitocôndria é uma das organelas que foi proposta como um alvo importante para o acúmulo de vanádio. A literatura mostra que compostos de vanádio são capazes de afetar as funções mitocondriais (ZHAO *et al.*, 2010). SOARES e colaboradores (2007), demonstraram que sais de vanadato reduzem o consumo de oxigênio sem que ocorra o desacoplamento mitocondrial, quando avaliado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Íons de vanádio podem se ligar a proteínas de choque térmico, como Hsp60, uma chaperona mitocondrial, e induzir sua despolarização. ZHAO e colaboradores (2010), demonstraram que o vanádio é capaz de induzir o *swelling* mitocondrial e perturbar o potencial de membrana, de maneira dose e tempo dependente, indicando alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Para elucidar melhor os efeitos tanto do polissacarídeo nativo, quanto do seu complexo com oxovanádio sobre as funções mitocondrias, é interessante estudos adicionais utilizando mitocôndrias isoladas, para avaliar, como por exemplo, a atividade dos complexos respiratórios e o potencial de membrana mitocondrial na presença dos compostos.

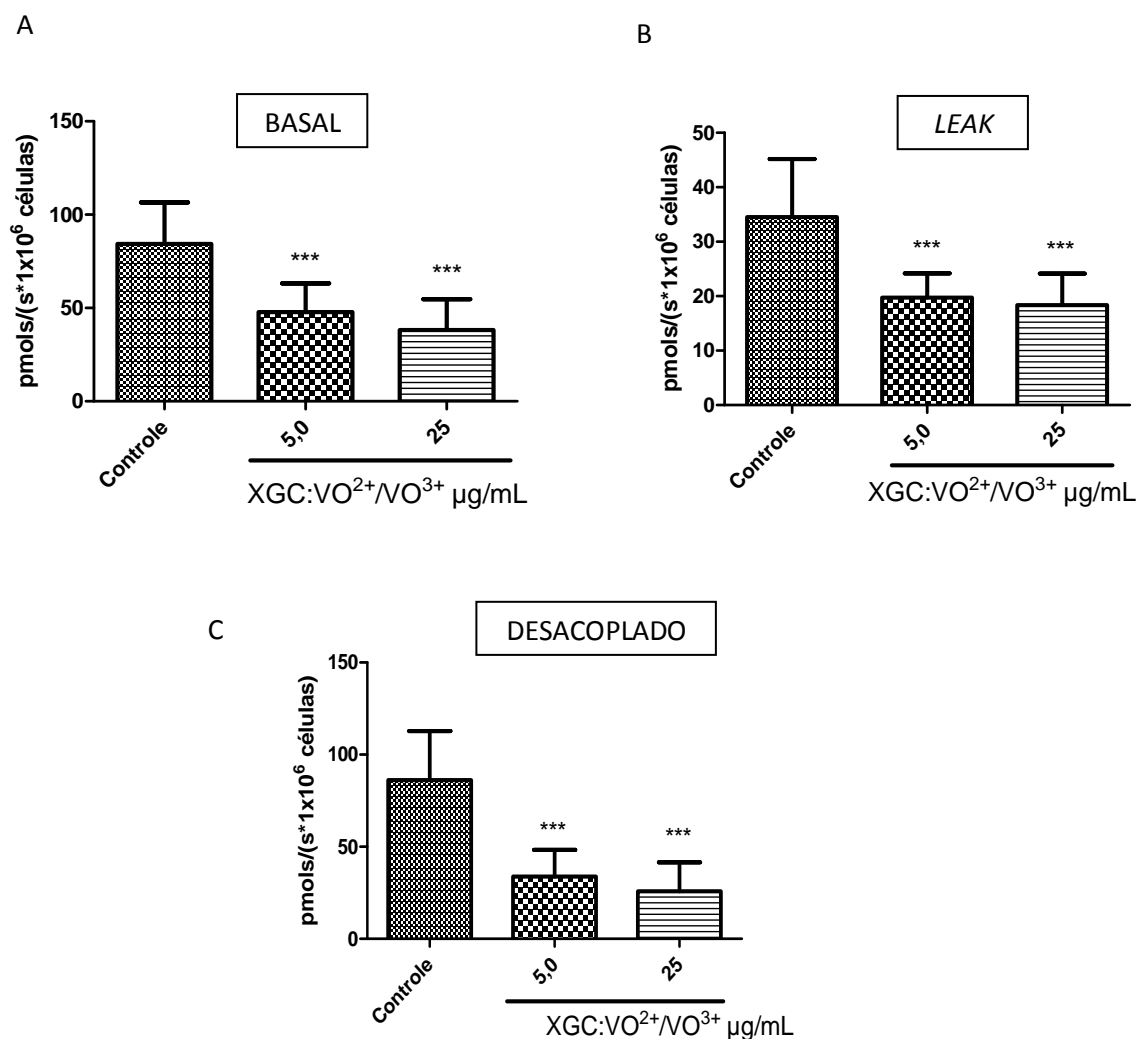


FIGURA 19: EFEITO DE XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A determinação do consumo de oxigênio foi realizada conforme descrito na seção de materiais e métodos (Item 4.6.6.1). A) estado basal da respiração, B) estado leak e C) estado desacoplado. Os resultados estão expressos como média ± DP de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. O grupo controle representa as células tratadas somente com meio de cultura.

### 5.6.2 Avaliação da produção de lactato e piruvato

Dando continuidade as avaliações dos efeitos dos compostos em estudo sobre o metabolismo de células tumorais, foram realizados em seguida os ensaios para a determinação da produção de lactato e piruvato pelas células B16F10.

A figura 20 apresenta os resultados obtidos para a produção de lactato (A) e piruvato (B) quando as células foram tratadas com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  após 24 horas de tratamento. A quantificação de lactato e piruvato foi realizada de maneira indireta, quantificando a formação ou oxidação de NADH, respectivamente e, posteriormente normalizado pela quantidade de proteínas presente na amostra.

O tratamento com a xiloglucana na sua forma nativa provocou um aumento na produção de lactato (figura 20 A), sendo este aumento de  $\sim 14\%$  e  $\sim 17\%$  para as concentrações de 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  de XGC, respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na produção de piruvato, quando as células foram expostas à XGC, exceto para a concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , que provocou uma leve diminuição na produção deste metabólito (Figura 20 B).

Uma vez que a xiloglucana em estudo afeta as funções mitocondriais, um mecanismo compensatório poderia estar ocorrendo, aumentando a redução de piruvato a lactato para prover energia para a célula, especialmente se a xiloglucana exercer efeito desacoplador na mitocôndria. A fim de melhor compreender o mecanismo que está levando ao aumento na produção de lactato, seria interessante avaliar a atividade da enzima lactato desidrogenase, bem como a taxa de consumo de glucose pela célula.

SILVEIRA (2010) demonstrou que o tratamento com 200  $\mu\text{g/mL}$  de xiloglucana obtida de Jatobá, também provoca um aumento na produção de lactato por células HeLa.

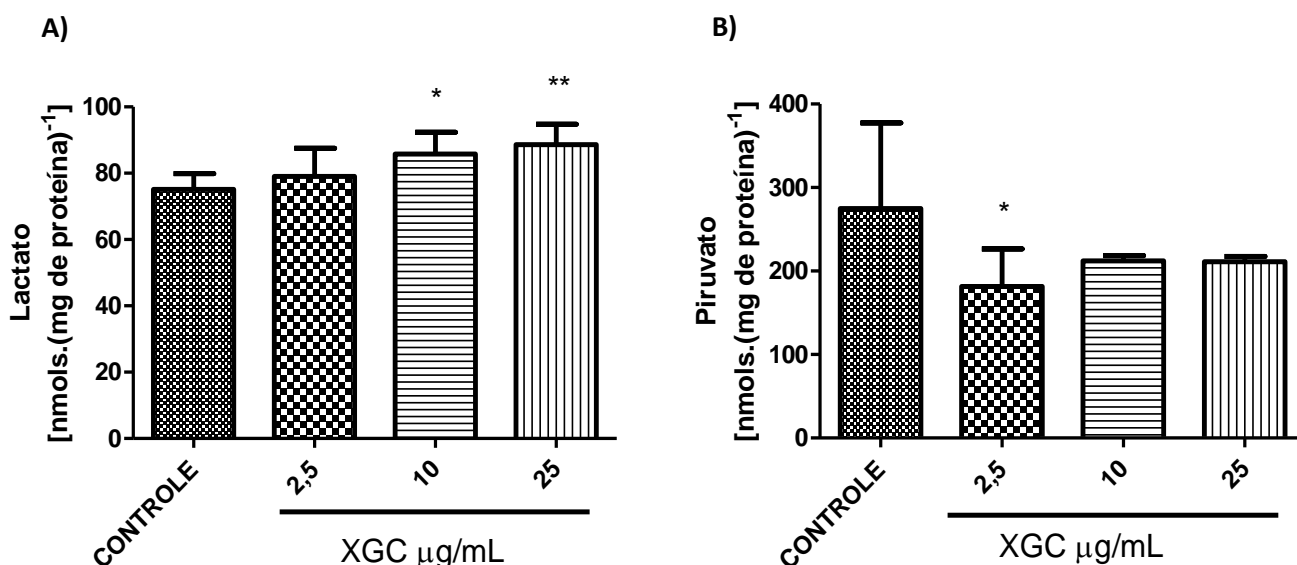


FIGURA 20: EFEITOS DE XGC SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita em materiais e métodos (item 4.6.6.2), após tratamento com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas. O grupo controle representa as células tratadas com meio de cultura. Para a quantificação de lactato (A) e piruvato (B) foi avaliado a formação ou a oxidação de NADH, respectivamente, considerado o  $\epsilon$  de 6220  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  e normalizado pela quantidade de proteínas da amostra. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de 5 experimentos independentes realizados em duplicata. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle.

Ao contrário do observado para XGC o tratamento com  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  não alterou de maneira significativa a produção de lactato pelas células B16F10, resultados visualizados na figura 21. Em contrapartida, a presença do complexo provocou uma importante diminuição na produção de piruvato, em torno de 34% e 22,5%, para as concentrações de 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em relação ao controle.

O complexo  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  parece exercer um efeito mais pronunciado na via glicolítica. A reduzida velocidade de consumo de oxigênio observada pode ser reflexo da diminuição na produção de piruvato. Uma vez que não ocorre um aumento concomitante na produção de lactato, a via glicolítica poderia estar sendo inibida pela ação do complexo. A fim de avaliar esta possibilidade, foi realizado em seguida a avaliação da produção de ATP, atividade da enzima glicolítica hexoquinase e expressão da piruvato quinase e ATP sintase.

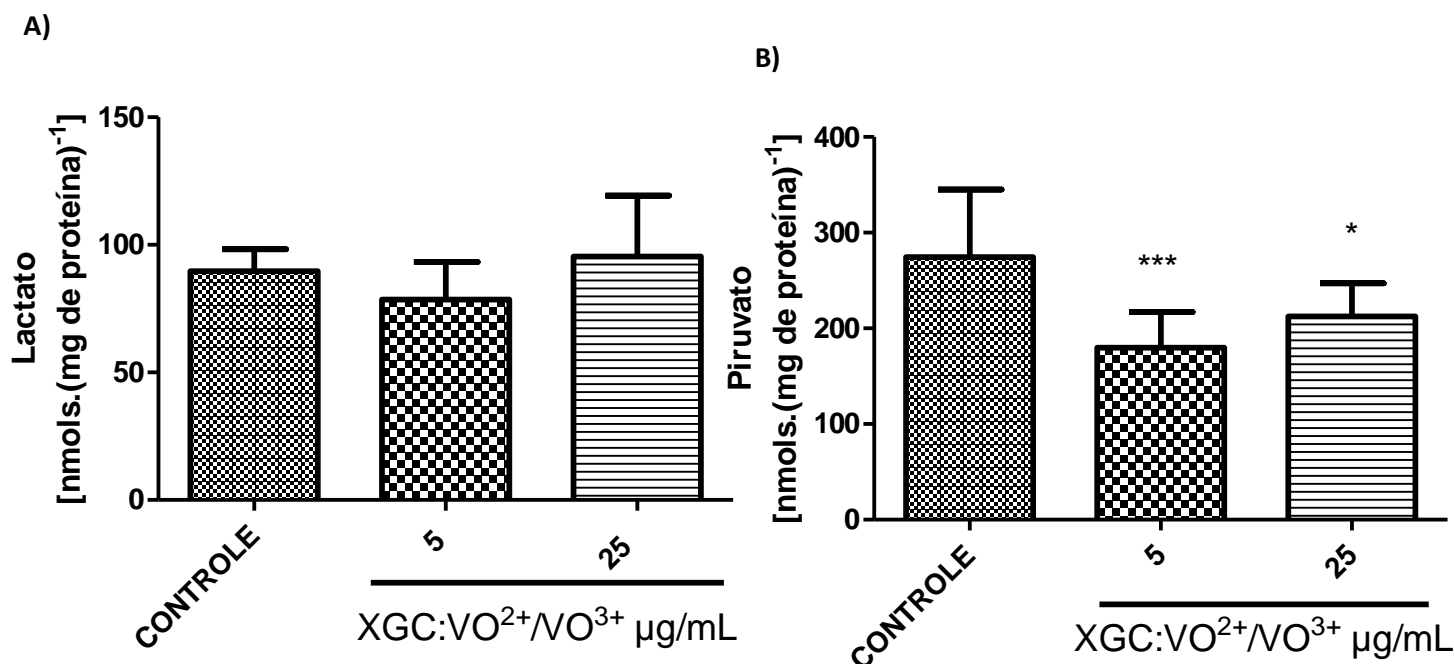


FIGURA 21: EFEITOS DE XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE A PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS B16F10.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita em materiais e métodos (item 4.6.6.2), após tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5 e 25 µg/mL por 24 horas. O grupo controle representa as células tratadas com meio de cultura. Para a quantificação de lactato (A) e piruvato (B) foi avaliado a formação ou a oxidação de NADH, respectivamente, considerado o  $\epsilon$  de 6220 mmol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup> e normalizado pela quantidade de proteínas da amostra. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de 5 experimentos independentes realizados em duplicata. \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

### 5.6.3 Avaliação da razão ADP/ATP

As concentrações de ADP e ATP foram avaliadas por HPLC conforme descrito no Item 4.4.6.3. A mensuração dos níveis dos nucleotídeos AMP, ADP e ATP, são usados amplamente para monitorar o estado energético, a atividade metabólica, estresse fisiológico e citotoxicidade em uma ampla gama de tipos celulares, uma vez que todas as células necessitam de ATP para manter suas funções normais (NAPOLITANO; SHAIN, 2005). Sendo assim, é utilizado para

determinar a inibição do crescimento de células tumorais por agentes citotóxicos. A utilização da determinação conjunta de ADP e ATP, por meio da razão ADP/ATP, permite também, avaliar a indução de apoptose, uma vez que a morte celular por esta via requer o gasto de ATP. Valores da razão ADP/ATP abaixo de 0,11 representam células viáveis; valores entre 0,11 e 1,0, representam células em apoptose e valores acima de 1,0, células em necrose (BRADBURY *et al.*, 2000).

A figura 22 ilustra um cromatograma representativo da quantificação de ADP e ATP. A figura mostra o cromatograma de uma amostra (linha azul) e cromatograma de uma amostra contaminada com um padrão comercial de ADP e ATP (linha vermelha) sobrepostos, a fim de confirmar os picos referentes ao ADP e ao ATP. O ADP apresenta um tempo de retenção próximo a 26 minutos e o ATP um tempo de retenção em torno de 30 minutos. Em destaque na figura 22, está representado também o espectro característico dos dois nucleotídeos, com um pico de absorvância em 257 nm.

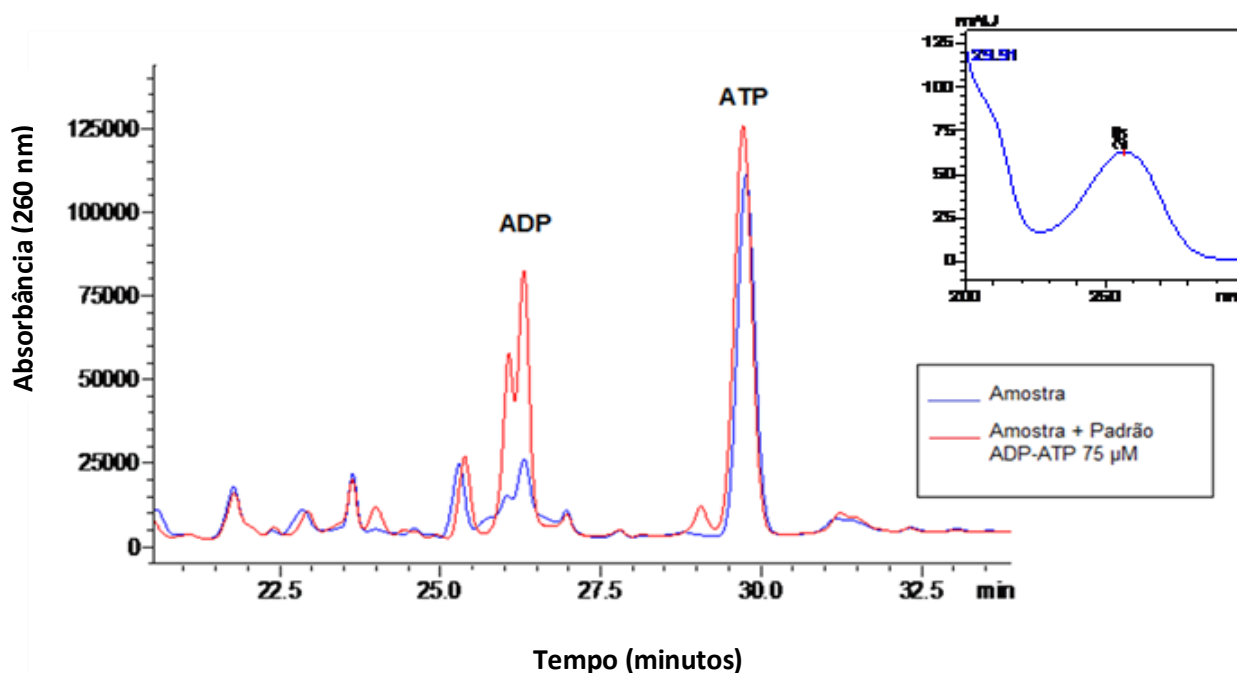


FIGURA 22: CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE ADP E ATP POR HPLC.  
FONTE: O autor (2012)

NOTA: Cromatograma representativo de uma amostra de células B16F10 (linha azul) sobreposta a um cromatograma de uma amostra contaminada com ADP e ATP comercial (linha vermelha). No quadro em destaque, o espectro obtido, demonstrando o pico de absorvância em 257 nm.

Após a quantificação do conteúdo de ADP e ATP, foi realizada a razão entre os dois nucleotídeos. Os resultados obtidos para as células tratadas com XGC e

XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> estão demonstrados na figura 23. Observa-se que os tratamentos das células com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25 µg/mL e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 1, 5 e 25 µg/mL, ambos durante 24 horas, não foram capazes de alterar a razão ADP/ATP em relação aos seus controles.

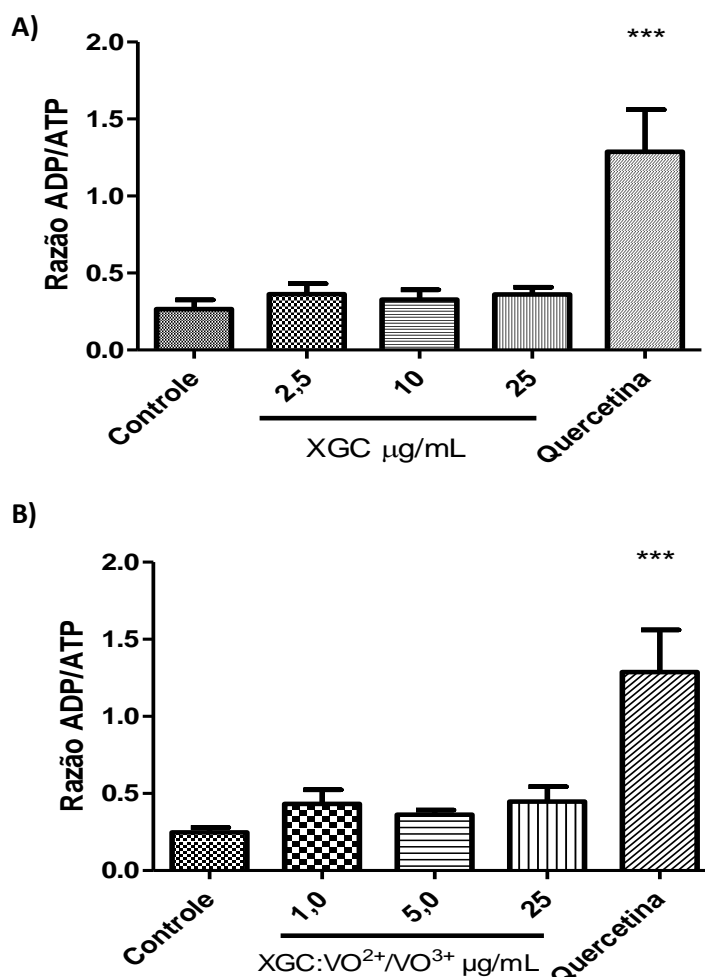


FIGURA 23: AVALIAÇÃO DA RAZÃO ADP/ATP DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A determinação da razão ADP/ATP foi determinada após quantificação das concentrações de ADP e ATP por HPLC, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 4.6.6.3). A) células tratadas com XGC nas concentrações de 2,5; 10 e 25 µg/mL e B) células tratadas com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 1, 5 e 25 µg/mL, ambos por 24 horas. O grupo controle representa as células tratadas com meio de cultura. Como controle positivo para apoptose foi realizado o tratamento com quercetina 300 µM. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

Os resultados dos parâmetros metabólicos avaliados sugerem que a via glicolítica parece sustentar os níveis de ATP necessários, quando a célula foi tratada com a xiloglucana nativa, conforme observado pelo aumento na produção de lactato.

Estudos mostram que, quando ocorre uma diminuição na produção de ATP mitocondrial, a atividade da proteína quinase ativada por AMP é aumentada. Ela reconhece e sinaliza os níveis de ATP:ADP e ativa transportadores de glucose (GLUT 1 e GLUT 4), aumentando a captação de glucose e, conseqüentemente a glicólise, para compensar a queda nos níveis de ATP. A atividade desta enzima está correlacionada com a progressão tumoral (KAHAN *et al.*, 2005; ASHRAFIAN *et al.*, 2006; HUE; RIDER, 2007). Medir o consumo de glucose poderia corroborar com esta informação. Para o tratamento com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> mesmo tendo ocorrido uma diminuição significativa do consumo de oxigênio e da produção de piruvato, o que poderia causar uma redução nos níveis de ATP, a razão ADP:ATP foi mantida nas células B16F10, embora um discreto aumento na razão quando as células foram tratadas com o complexo tenha sido observado, porém não estatisticamente significativo em relação ao controle (figura 26B).

#### 5.6.4 Avaliação da atividade da enzima hexoquinase

A atividade da enzima glicolítica hexoquinase foi avaliada indiretamente por meio da quantificação de NADPH formado pela reação da enzima acoplada à enzima Glucose 6-fosfato desidrogenase, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (Item 4.4.6.4). Conforme ilustrado na figura 24, o tratamento com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL não foram capazes de alterar a atividade enzimática nas condições experimentais. Observa-se uma discreta inibição na atividade da enzima com a concentração de 5 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, no entanto esta diferença em relação ao controle não foi significativa.

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura a respeito dos efeitos de polissacarídeos e/ou vanádio nas enzimas da via glicolítica, entre elas, a hexoquinase. No entanto, esta enzima tem sido um importante alvo em estudos que visam o efeito antitumoral de possíveis agentes terapêuticos, demonstrando que a inibição da atividade da hexoquinase, especialmente a isoforma II, está correlacionada com a inibição do crescimento tumoral (PENSO e BEITNER, 1998;



IHRLUND *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2011; WOLF *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011).

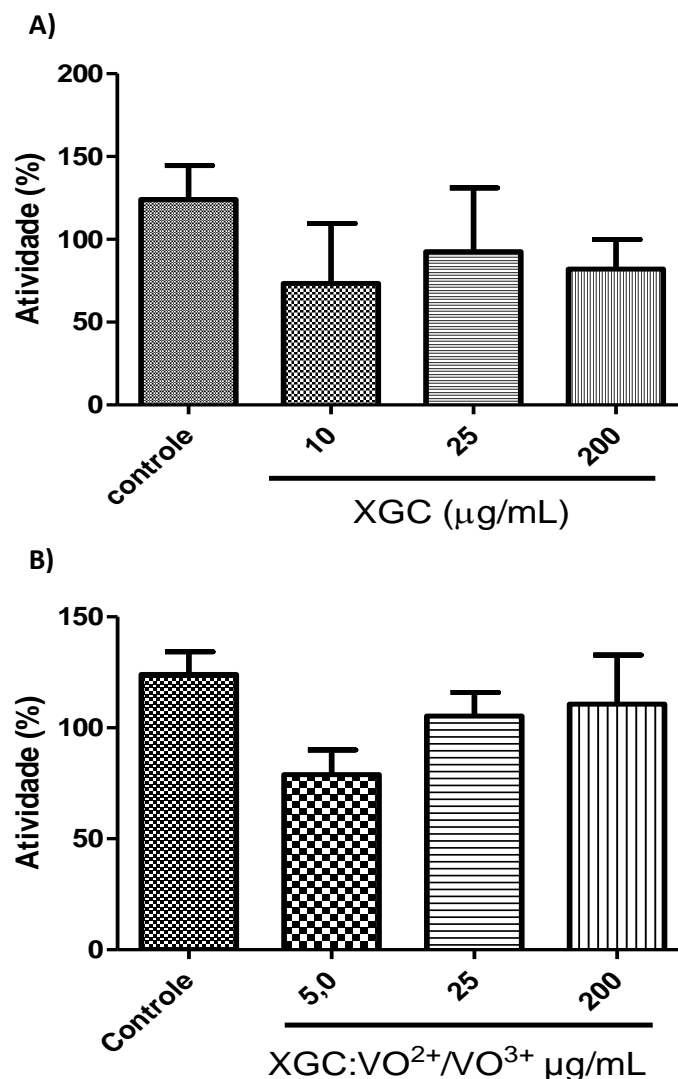


FIGURA 24: EFEITOS DO TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA HEXOQUINASE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A atividade enzimática foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 4.6.6.4). A) células tratadas com XGC nas concentrações de 10, 25 e 200 µg/mL e B) células tratadas com XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 5, 25 e 200 µg/mL, ambos por 24 horas. O grupo controle, considerado 100% de atividade corresponde a 34,07 nmols de NADPH formado por mg de proteínas. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes realizados em duplicata.  $p > 0,05$ .

#### 5.7.5 Análise da expressão gênica da enzima piruvato quinase

A avaliação dos níveis de mRNA da enzima glicolítica piruvato quinase, foi realizado por RT-qPCR, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (Item 4.4.7). As células foram tratadas por 24 horas com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 25 e 200 µg/mL. Após a extração do RNA total, foi realizado uma corrida em gel de agarose, a fim de confirmar a integridade deste RNA extraído (figura 25).

O transcrito da piruvato quinase foi normalizado pelo transcrito de dois genes constitutivos de controle interno, utilizando o *software* geNorm. Os genes de controle interno são: GAPDH (gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase) e HPRT (hipoxantina fosforribosiltransferase). Os resultados obtidos para o tratamento com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> estão ilustrados na figura 26 (A e B, respectivamente). Ambos os tratamentos não foram capazes de modular de maneira significativa a expressão deste gene ( $p > 0,05$ ). No entanto, é possível observar que ocorreu uma tendência em diminuir os níveis de transcrito com o tratamento de XGC 200 µg/mL e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 25 e 200 µg/mL, pelo tempo de 24 horas.

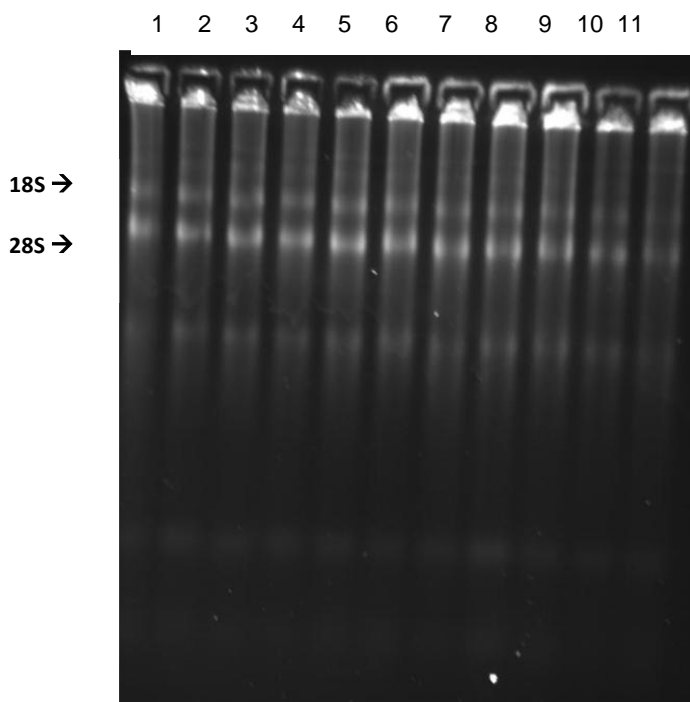


FIGURA 25: GEL DE RNA EXTRAÍDO DE CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Gel de eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1,5%. 1) controle 1; 2) XGC 25 µg/mL 1; 3) XGC 200 µg/mL 1; 4) XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 25 µg/mL 1; 5) XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 200 µg/mL 1; 6) controle 2; 7) XGC 25 µg/mL 2; 8) XGC 200 µg/mL 2; 9) XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 25 µg/mL 2; 10) XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 200 µg/mL 2a; 11) XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> 200 µg/mL 2b.

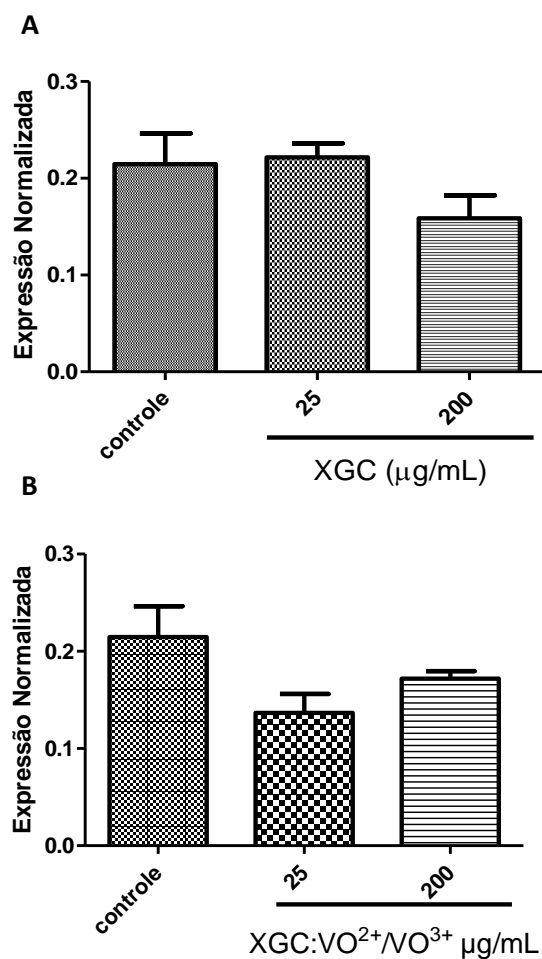


FIGURA 26: EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA PIRUVATO QUINASE M2 APÓS TRATAMENTO COM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>.

FONTE: O autor (2012)

Nota: A) células tratadas com XGC nas concentrações de 25 e 200 µg/mL e B) células tratadas com 25 e 200 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, ambos pelo período de 24 horas. A condição controle representa células tratadas com meio de cultura. Os resultados estão demonstrados como expressão relativa do gene da piruvato quinase frente à expressão dos genes de controle interno (GAPDH e HPRT). Resultados expressos como média ± DP de 2 experimentos independentes realizados em duplicata,  $p > 0,05$ .

#### 5.6.6 Análise da expressão gênica da subunidade $\beta$ da ATP sintase ( $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase)

A F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintase é um grande complexo protéico localizado na membrana mitocondrial interna. Este complexo é o principal fornecedor de ATP na maioria das

células, sintetizando-o na fase final da fosforilação oxidativa. Este complexo é composto por 16 diferentes subunidades, sendo:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , fazendo parte do componente  $F_1$ , fração periférica que sintetiza o ATP e, a, b, c, d, e, f, g compondo a fração  $F_o$ , fração imersa na membrana que realiza a translocação de prótons. (BRANCA, 2004; CHANG *et al*, 2007 e SÁNCHEZ-CENIZO, 2010). Na presença de um gradiente de prótons, o complexo  $F_1F_o$  sintetiza ATP ( $F_1F_o$  ATP sintase), entretanto, se não existe potencial de membrana ou gradiente de prótons, a subunidade  $F_1$  é isolada de  $F_o$  e participa na hidrólise do ATP ( $F_1$  ATPase) (CHANG *et al*, 2007).

A avaliação dos níveis de mRNA da subunidade  $\beta$  da fração  $F_1$  da  $F_1F_o$  ATP sintase foi realizado por RT-qPCR, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (Item 4.4.7). As células foram tratadas por 24 horas com XGC e XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> nas concentrações de 25 e 200  $\mu\text{g/mL}$ . Após a extração do RNA total, foi realizado uma corrida em gel de agarose, a fim de confirmar a integridade deste RNA extraído (figura 25).

Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 27. Observa-se que o tratamento com XGC não foi capaz de modular a expressão deste gene (figura 27A). Por outro lado, quando este polissacarídeo foi complexado com vanádio, ocorreu uma modulação negativa nas células tratadas com a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , em relação ao controle (figura 27B).

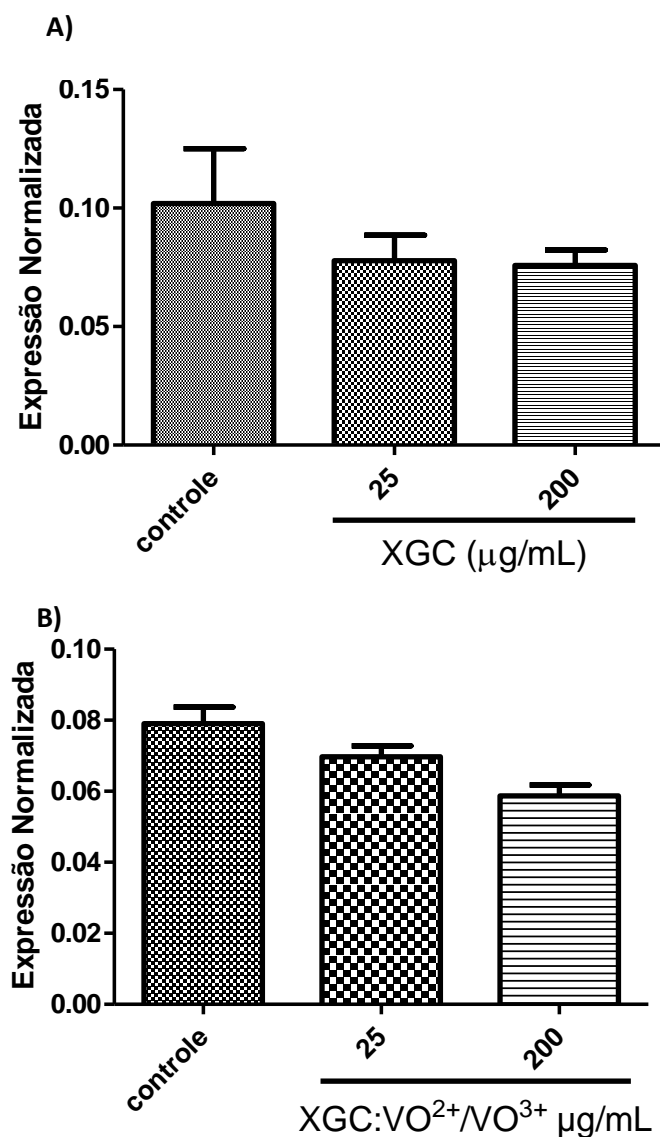


FIGURA 27: EXPRESSÃO GÊNICA DA SUBUNIDADE BETA DA ATP SINTASE APÓS TRATAMENTO COIM XGC E XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>.

FONTE: O autor (2012)

Nota: A) células tratadas com XGC nas concentrações de 25 e 200 µg/mL e B) células tratadas com 25 e 200 µg/mL de XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>, ambos pelo período de 24 horas. A condição controle representa células tratadas com meio de cultura. Os resultados estão demonstrados como expressão relativa do gene da ATP sintase frente à expressão dos genes de controle interno (GAPDH e HPRT). Resultados expressos como média ± DP de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

A ATP sintase apresenta alta atividade sob condições de acidose, característica esta, comum no microambiente da célula tumoral (PAN *et al.*, 2011). Relatos da literatura demonstram que a ATP sintase está superexpressa em alguns cânceres. Em modelo de câncer colorctal, o aumento nos níveis de expressão da ATP sintase correlacionou-se de maneira positiva com a ocorrência de metástase hepática (CHANG *et al.*, 2007). A superexpressão da subunidade  $\beta$  foi encontrada em amostras de metástase pulmonar e de linfonodos, utilizando modelo *in vivo* de câncer de mama (SPAÑA *et al.*, 2005). Em outro estudo com carcinoma mamário, o aumento da expressão da ATP sintase foi fortemente correlacionado com o tamanho e o estágio do tumor. A alta expressão deste complexo quando comparada com o tecido normal, indica que ele pode servir como biomarcador para o diagnóstico do câncer, bem como avaliação prognóstica do câncer de mama (PAN *et al.*, 2011).

KATAGATA; KONDO (1997) demonstraram um aumento na expressão da subunidade  $\alpha$  do complexo em células de melanoma metastático. Aumento na expressão da subunidade  $\alpha$  também foi encontrado em células de hepatocarcinoma e câncer de próstata (PAN *et al.*, 2011). CHANG e colaboradores (2007) demonstraram que uma interrupção em qualquer uma das subunidades do complexo, resulta em uma menor capacidade invasiva de células de câncer de cólon humana. Com base nesses achados, estudos recentes têm focado na ATP sintase como alvo na terapia contra o câncer, usando modelos animais e linhagens celulares (CHANG *et al.*, 2007).

Nossos resultados indicam que o complexo de xiloglucana com o metal de transição vanádio é capaz de modular negativamente a subunidade  $\beta$  da ATP sintase.

## 6. DISCUSSÃO FINAL

O melanoma maligno é o tipo de câncer de pele mais agressivo e com alta taxa de mortalidade, principalmente devido a sua capacidade de se disseminar para os tecidos distantes, formando metástases e a baixa resposta aos tratamentos existentes (RONDEPIERRE *et al.*, 2010). As terapias atuais que empregam compostos alquilantes, entre eles, a dacarbazina, quimioterápico de escolha para o tratamento do melanoma, desenvolvem uma alta toxicidade ao paciente, desta forma a busca por novas terapias, bem como o estudo de novos alvos moleculares é de extrema importância.

Compostos biologicamente ativos, em especial, os derivados de plantas, destacam-se como potenciais candidatos para a formulação de novas drogas e na terapia adjuvante do câncer (KOEHN; CARTER, 2005). Nos últimos anos, polissacarídeos provenientes de diversas fontes têm atraído a atenção de pesquisadores devido à suas potentes ações biológicas, entre elas, a ação antitumoral e imunoestimulante (CHEN *et al.*; 2011; ZHANG; DAI, 2011; LUO *et al.*, 2012). Acredita-se que a atividade antitumoral de polissacarídeos era consequência da estimulação de células do sistema imune (CAO *et al.*, 2006). De fato, a estimulação do sistema imune contribui para a destruição da célula tumoral, deste modo, a atividade imunoestimulante está diretamente relacionada com a atividade antitumoral de polissacarídeos. A ativação de macrófagos leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como de óxido nítrico (NO $\cdot$ ), que por sua vez, levam à destruição das células tumorais (XU *et al.*; 2011; JEONG *et al.*, 2012). A xiloglucana de *Copaifera langsdorffii*, em estudo neste trabalho, é capaz de estimular macrófagos, conforme descrito em estudo realizado por ROSÁRIO e colaboradores (2011), que demonstraram que este polissacarídeo estimulou a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais de camundongos, de maneira dose dependente. Estes achados nos motivaram a continuar o estudo desta xiloglucana e, verificar seu efeito direto nas células tumorais. Conforme demonstrado na seção de resultados e discussão deste trabalho, polissacarídeos são capazes de exercer efeitos citotóxicos diretos frente a células tumorais e não apenas via estimulação de células do sistema imune.

Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a xiloglucana de *Copaifera langsdorffii* é capaz de reduzir a viabilidade de células de melanoma B16F10 de maneira significativa, bem como reduzir sua proliferação, exercendo assim efeito citostático importante (figuras 5A e 6A). Ainda, quando complexada com oxovanádio, os efeitos se tornam mais pronunciados (figuras 5B e 6B). No entanto, as análises de ciclo celular (figuras 8 e 10) indicam que a redução na proliferação não ocorreu devido à parada de ciclo celular.

Conforme discutido neste trabalho, diferentes polissacarídeos apresentam efeitos distintos em relação à proliferação e apoptose de células tumorais. Sabe-se que, dependendo da estrutura, composição monossacarídica e peso molecular, polissacarídeos podem ter diferentes propriedades funcionais (CAO *et al.*, 2010; WIJESINGHE *et al.*, 2012; YANG, *et al.*, 2012). Além disso, deve-se levar em consideração também, o tipo de células em estudo. Este trabalho demonstrou que a xiloglucana na sua forma nativa não é capaz de induzir morte celular na linhagem B16F10. Sabe-se que células de melanoma são extremamente resistentes à indução de apoptose, devido provavelmente à superexpressão de Bcl-2 e aumento da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (WANG *et al.*, 2011). A ocorrência de morte celular só foi obtida com alta concentração do complexo XGC:VO<sup>2+/3+</sup>, demonstrando que a presença do metal, neste caso, é essencial para esse efeito. No entanto, foi verificado que esta indução não envolve a liberação de citocromo c (figura 16), que consequentemente não envolve a via intrínseca de apoptose. Sendo assim, torna-se necessário estudos adicionais a fim de esclarecer o mecanismo de morte provocado pelo complexo deste polissacarídeo com oxovanádio. Uma vez que alguns estudos indicam que o vanádio induz clivagem de DNA por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EVANGELOUS, 2002), seria interessante mensurar os níveis destas espécies produzidas após o tratamento com o complexo XGC:VO<sup>2+/3+</sup>.

Atualmente, a pesquisa no câncer está sendo direcionada para o metabolismo anormal das células tumorais, com a perspectiva de que agentes anticancerígenos sejam mais específicos (DOMENIS *et al.*, 2011). Importantes diferenças entre as vias metabólicas de células normais e tumorais são conhecidas desde a década de 20. No entanto, a causalidade entre câncer e efeito Warburg permanece desconhecido (MARKOVETS *et al.*, 2011). Em contraste com numerosos estudos de vias de sinalização no melanoma, poucos estudos têm sido conduzidos a cerca do metabolismo neste tipo de câncer (SCOTT *et al.*, 2011). SCOTT e colaboradores



(2011) demonstraram que células de melanoma consomem mais glucose e produzem quantidades elevadas de lactato em relação aos melanócitos. Ainda, estes autores demonstraram que o ciclo do ácido cítrico permanece funcional em células de melanoma, mesmo em condições de hipóxia, indicando que o metabolismo neste câncer não é puramente via glicólise.

Entre as enzimas da via glicolítica que estão alteradas nas células tumorais, encontram-se a hexoquinase e a piruvato quinase. Por desempenharem importante papel na reprogramação metabólica da célula tumoral, estas duas enzimas foram alvos de estudo do presente trabalho. O tratamento com XGC e  $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$  não foi capaz de alterar a atividade da hexoquinase, bem como de modular a expressão da piruvato quinase, embora, ocorreu uma tendência em diminuir a expressão desta última enzima (figura 26). Altos níveis de piruvato quinase, isoforma M2 (PKM2), está presente em linhagens de melanoma (RONDEPIERRE *et al.*, 2010). UGUREL e colaboradores (2005) demonstraram que a PKM2 está elevada no plasma de pacientes com melanoma comparado à pacientes saudáveis. Ainda, os autores demonstraram que a concentração plasmática de PKM2 está correlacionada com o estágio da doença e a sobrevida do paciente, sendo que pacientes com maiores níveis desta enzima apresentaram sobrevida reduzida em relação aos pacientes com níveis mais baixos de PKM2. Sendo assim, esta enzima é um atraente alvo terapêutico no câncer.

Dando continuidade aos efeitos dos compostos em estudo no metabolismo da célula B16F10, foi demonstrado neste trabalho que XGC provoca um leve aumento na produção de lactato (figura 20). Este achado pode ser devido a um mecanismo compensatório, estimulando a redução de piruvato a lactato na via glicolítica, em detrimento de uma função mitocondrial alterada, evidenciada pelo aumento no consumo de oxigênio pelas células após o tratamento com o polissacarídeo (figura 18). De maneira contrária, o complexo  $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$  não causou alteração na produção de lactato, por outro lado, diminuiu a produção de piruvato (figura 21), indicando uma possível inibição da via glicolítica. Ainda, o complexo reduziu de maneira importante o consumo de oxigênio pelas células, indicando que é capaz de inibir a função mitocondrial (figura 19). Além disso, o complexo foi capaz de modular negativamente a expressão da subunidade  $\beta$  da ATP sintase, outro alvo importante na terapêutica do câncer. Não podemos excluir o fato de que outros componentes da fosforilação oxidativa também podem estar sendo afetados, sendo assim, torna-

se necessário, em estudos futuros, avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória. Pedersen e colaboradores (2010) sugerem que uma estratégia para suprimir a proliferação de células tumorais de forma eficiente, seria o bloqueio simultâneo da via glicolítica e da produção de ATP via mitocondrial.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que tanto a forma nativa da xiloglucana, bem como seu complexo com oxovanádio, exerce importante efeito antitumoral frente a células B16F10. No entanto, se fazem necessários mais estudos a fim de investigar o mecanismo molecular de ação destes compostos, bem como, posteriormente, estudos *in vivo*, para avaliar a participação da ativação de macrófagos pela XGC, já observada *in vitro* (ROSÁRIO *et al.*, 2011) nos efeitos antitumorais, a fim de avaliar o potencial uso terapêutico destes compostos no tratamento do melanoma.

## 7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- Tanto a forma nativa da xiloglucana (XGC) quanto o seu complexo com oxovanádio ( $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ ) reduzem a viabilidade e a proliferação de células B16F10, exercendo assim, importante efeito antitumoral;
- A diminuição na proliferação celular não ocorre devido à parada de ciclo celular;
- XGC e  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  provocam alterações morfológicas apenas na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ ;
- A xiloglucana nativa não é capaz de induzir marcação com anexina/PI, ao contrário de  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ ;
- XGC e  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  não induzem liberação de citocromo c nas células de melanoma;
- XGC e  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  afetam de maneira importante o consumo de oxigênio pelas células B16F10, caracterizado por um aumento na velocidade do consumo quando as células são tratadas com XGC e uma inibição pronunciada no consumo de oxigênio com  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$ ;
- Ambos os tratamentos não alteram a razão ADP/ATP das células;
- XGC provoca leve aumento nos níveis de lactato, enquanto  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  provoca uma diminuição nos níveis de piruvato produzido pela célula, indicando uma possível interferência na via glicolítica;
- XGC e  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  não modulam a atividade da enzima hexoquinase e nem a expressão da enzima piruvato quinase isoforma M2 nestas condições experimentais;
- Por fim, o tratamento com  $\text{XGC:VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  modula negativamente a expressão da subunidade  $\beta$  da  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP sintase na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMID, G.; ANWAR-MOHAMED, A.; ELMAZAR, M.M.; EL-KADI, A.O. Modulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1554-61, 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**, 4ed., Artmed, Porto Alegre, 2002.

ALBERTSSON, P.A.; BASSE, P.H.; HOKLAND, M.; GOLDFARB, R.H.; NAGELKERKE, J.F.; NANNMARK, U.; KUPPEN, P.J.K. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. **Trends in Immunology**, v. 24, N.11, p. 603-609, 2003.

ALIPRANDINI, E. Efeito da melanina e do oxigênio singlete na morte celular e fluxo de cálcio em células melan-a e b16-f10. [Dissertação de mestrado] **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, 2010

ALONSO, S.R.; ORTIZ, P.; PEREZ-GOMEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; ACUÑA, M.J. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. **The American Journal of Pathology**. V.164, n.1, p.193-203, 2004.

**ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY**. Disponível em: <[http://www.cancer.org/docroot/lrn/lrn\\_0.asp](http://www.cancer.org/docroot/lrn/lrn_0.asp)> Acesso em: 15/07/2010.

ANDERSON, C.M.; BUZAID, A.C.; LEGHA, S.S. Systemic treatment for advanced cutaneous melanoma. **Oncology**, v. 9, p. 1149-158, 1995.

APPAIX, F.; MINATCHY, M.N.; RIVA-LAVIELLE, C.; OLIVARES, J. ANTONSSON, B. SAKS, V.A. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochimica et Biophysica Acta**. Arnsterdam, v. 1457, p. 175-181, 2000.

ASHRAFIAN, H. Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis. **Lancet**, v. 367, n. 9510, p. 618-21, 2006.

BAE, J.S; JANG, K.H.; YIM, H.; JIN, H.K. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. **Cancer Letters**, v. 218, n. 1, p. 43-52, 2005.

BALDI, A.; SANTINI, D.; DE LUCCA, A.; PAGGI, M.G. cDNA array technology in melanoma: an overview. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 219-223, 2003.

BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 80, n. 1-2, p. 1-10, 2000.

BARRIO, D. A. et al. Vanadyl(IV) complexes with saccharides. Bioactivity in osteoblast-like cells in culture. **Cancer Journal of Physiology Pharmacology**, v. 84, n. 7, p. 765-775, 2006.

BARRIO, D.E. Potential Use of Vanadium Compounds in Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3632-3642, 2010.

BAYLEY, J.P.; DEVILEE, P. The Warburg effect in 2012. **Current Opinion Oncology**, v. 24, n. 1, p. 62-7, 2012.

BASILE, A.C.; SERTIE, J.A.; FREITAS, P.C.D. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian copaiba. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.101- 9, 1988.

BENNETT, D.C., COOPER, P.J. e HART, I.R. A Line of Non-Tumorigenic Mouse Melanocytes, Syngeneic with the B16 Melanoma and Requiring a Tumor Promoter for Growth. **International Journal Cancer**, v.39, p.414-418. 1987.

BIELESKI, R.L. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. **Plant Physiology**. v.203, p. 213-219, 1993.

BISHAYEE, A. et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. **Cancer Letter** v. 294, n. 1, p. 1-12, 2010.

BOHN, J.A e BeMILLHER J.N. (1-3)  $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of struture-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p.3-14, 1995.

BOSSY-WETZEL, E. AND GREEN, D.R. Detection of Apoptosis by Annexin V Labeling. **Methods Enzymol**. V. 322, p. 15-18, 2000.

BRADBURY, D.A.S.; SLATER, K.J.; CROUCH, S.P.M. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. **Journal Immunology Methods**, v. 40, p. 79-92, 2000.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.

BHARDWAJ, V. Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. **Anticancer Research**, v. 30, n. 3, p. 743-9, 2010.

BRANCA, D. F1–F0 ATP Synthase. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, v. 2, 2004.

BRAUN, R.D.; BEATTY, A.L. Modeling of oxygen transport across tumor multicellular layers. **Microvascular Research**, v. 73, n. 2, p. 113-23, 2007.

BRITO, N.M.B.; BRITO, M.V.H.; CARVALHO, R.K.V.; MATOS, L.T.M.B.; LOBATO, R.C.; CORREA, S.C.; BRITO, R.B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.25, n.2, 2010.

BROHEM, C.A.; SAWADA, T.C.H.; MASSARO, R.R.; ALMEIDA, R.L.; RIVELLI, D.P.; ROPKE, C.D.; LIMA, T.M.; CURI, R.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in vitro**, v.23, p.111-19, 2009.

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S.J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 235-40, 2008.

BUCKERIDGE, M.S; DIETRICH, S.M.C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v. 117, p.33-43, 1996.

BUCKERIDGE M.S., SANTOS H.P., TINE M.A. Mobilisation of storage cell wall polyssaccharides in seeds. **Plant Physiology Biochemistry**., v. 38, p. 141-56, 2000.

BURGALASSI, S., PANICHI, L., SAETTONE, M.F., JACOBSEN, J., RASSING, M.R. Development and in vitro/in vivo testing of mucoadhesive buccal patches releasing benzydamine and lidocaine. **International Journal Pharmacology**, v.133, p.1–7, 1996.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry** v. 58, p. 525-531, 2001.

CAO, W. L., X-Q.; LIU, L.; YANG, T-H.; LI, C.; FAN, H-T.; JIA, M.; LV, Z-G.; MEI, Q-B. . Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. **Carbohydrate Polymers** v. 66, p. 149-159, 2006.

CAO, Y.; IKEDA, I. Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 45 p. 231–235, 2009.

CAO, W. L., XQ.; WANG, X.;FAN, HT.; ZHANG, XN.; HOU, Y.; LYU, SB E MEI, QB. . A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway. **Phytomedicine** v. 17, p. 598-605, 2010.

CHANG, H. J.; LEE, M. R.; HONG, S. H.; YOO, B. C.; SHIN, Y. K.; JEONG, J. Y.; LIM, S. B.; CHOI, H. S.; JEONG, S. Y.; PARK, J. G. Identification of mitochondrial FoF1-ATP synthase involved in liver metastasis of colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 8, p. 1184-91, 2007

CHE, Z.M.; JUNG, T.H.; CHOI, J.H.; YOON, D.J.; JEONG, H.J.; LEE, E.J.; KIM, J. Collagen-based co-culture for invasive study on cancer cells-fibroblasts interaction. **Biochem Biophys Res Commun**, **346**:268–275, 2006.

CHEN, Q.; YANG, G.W.; AN, L.G. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by Ginkgo biloba seed polysaccharide. **World Journal Gastroenterology**, v. 8, n. 5, p. 832-6, 2002.

CHEN, X.; NIE, W.; YU, G.; LI, Y.; HU, Y.; LU, J.; JIN, L. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **Food Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 695-700, 2011

CHIN, L.; GARRAWAY, A.L.; FISHER, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes Dev.**, v. 20, p. 2149-2182, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829-37, 2004.

CLOSS, C.B.; CONDE-PETIT, B.; ROBERTS, I.D.; TOLSTOGUZOV, V.B.; ESCHER, F. Phase separation and rheology of aqueous starch/galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p.67-77, 1999.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E.H.C; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 64, p. 21-28, 2010.

CRUZ, O. U., FM. metvan a novel oxovanadium complex with broads spectrum anticancer activity. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 11, n. 12, p. 1829-1836, 2002.

CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **J Pathol**, v. 189, p. 300–308, 1999.

CZOC, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. **Methods in Enzymology Analyze**, Weinheim, p. 1446-1451, 1974.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on "click chemistry". **Cytometry A**, v. 79, n. 5, p. 328-37, May 2011.

DE LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**, v.46, p.157-63, 2001.

DIAZ-RUIZ, R.; URIBE-CARVAJAL, S.; DEVIN, A e RIGOULET, M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. **Biochemistry Biophysics Acta**, v.1796, p.252-65, 2009.

DOMENIS, R.; COMELLI, M.; BISETTO, E.; MAVELLI, I. Mitochondrial bioenergetic profile and responses to metabolic inhibition in human hepatocarcinoma cell lines with distinct differentiation characteristics. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 5, p. 493-505, 2011

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anaytical. Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHONE, J.; BUCHENAUER, H. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p. 457–470, 2009.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 42, n. 3, p. 249-65, Jun 2002.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. Atheneu, São Paulo, 2004.

ESPANA, L.; MARTIN, B.; ARAGUES, R.; CHIVA, C.; OLIVA, B.; ANDREU, D.; SIERRA, A. Bcl-x(L)-mediated changes in metabolic pathways of breast cancer cells: from survival in the blood stream to organ-specific metastasis. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 4, p. 1125-37, 2005

FANECA, H. F., VA.; TOMAZ, I.; GONÇALVES, G.; AVECILLA, F.; PEDROSO DE LIMA, MC.; GERALDES, CFGC.; PESSOA, JC.; CASTRO, M. Vanadium compounds as therapeutic agents: Some chemical and biochemical studies. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 601-608, 2009.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, p.53-6, 1992.

FERREIRA, L.M.R. Cancer metabolism: The Warburg effect. **Experimental Molecular Pathology**, 2010.

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.311-21, 2002.

FREITAS, R.A.; SANTOS, G.L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v.60, p.507-14, 2005.

FUJIMOTO S, FURUE H, KIMURA T, KONDO T, ORITA K, TAGUCHI T, *et al*. Clinical outcome of postoperative adjuvant immunochemotherapy with sizofiran for patients with resectable gastric cancer: a randomised controlled study. **European Journal Cancer**, v.27, p. 1114-8, 1991.

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M.S.; PASQUINI, P.; PICCONI, O.; BOYLE, P. Meta analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **European Journal Cancer**, v.41, n.1, p.45-60, 2005a

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M.S.; PASQUINI, P.; ZANETTI, R.; MASINI, C. Meta analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **European Journal Cancer**., v.41, n.14, p.2040-59, 2005b



GARRETT, MD.; WORKMAN, P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium, **European Journal Cancer**, 99: 280-284, 1999.

GHIORZO, P.; SCARRÀ, G.B. Genetics of melanoma susceptibility. **Forum (Genova)**, v. 13, p. 114-122, 2003.

GONCALVES, A. P.; VIDEIRA, A.; SOARES, P.; MAXIMO, V. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. **Life Science**, v. 89, n. 11-12, p. 371-7, 2011.

GONG, L.; CUI, Z.; CHEN, P.; HAN, H.; PENG, J.; LENG, X. Reduced survival of patients with hepatocellular carcinoma expressing hexokinase II. **Medical Oncology**, 2011.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, 2007.

GREEN, M.R. Targeting target therapy. **New England Journal of Medicine**, v.350, p.2191-93, 2005.

GUERRA, M.R.; GALO, V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira Cancer**, v.51, n.3, p.227-34, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p. 335-43, 2007

GULLFOT, F.; IBATULLIN, F.M., SUNDQVIST, G., DAVIES, G.J., BRUMER, H. Functional characterization of xyloglucan glycosynthases from GH7, GH12, GH16 scaffolds. **Biomacromolecules**, v.10, p.1782-88, 2009.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W.A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods in Enzymology Analyze**, Weinheim, p. 1464-1469, 1974.

HASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell. Research.**, v. 18, p. 150-159, 2005.

HAN, J. Y.; McDONALD, C. A study of nonstarch carbohydrate in enzyme treated hard red spring wheat gluten. **Food Research International**, v. 31, p. 511-519, 1999.

HAN, S. L., XW; KANG, J.S; YOON, Y.D; LEE, KH; ; LEE, K. P., SK; KIM, HM. Acidic polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits melanoma cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion. **International Immunology** v. 6, p. 697-702, 2006.

HASHIMOTO K, OKAWA Y, SUZUKI K, OKURA Y, SUZUKI S, SUZUKI M. Antitumor activity of acidic mannan fraction from Bakers' yeast. **J Pharmacobiodyn**, v.6, p.668-76, 1983.

HAYASHI A, GILLEN A.C, LOTT J.R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Alternative Medicine Review**, v.5, p.546-52, 2000.

HENSEL, A.; MEIER, K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. **Planta Medica**., v. 65, p. 395-399, 1999.

HIRUN, N.; TANTISHAIYAKUL, V.; PICHAYAKORN, W. Effect of Eriochrome Black T on the gelatinization of xyloglucan investigated using rheological measurement and release behavior of Eriochrome Black T from xyloglucan gel matrices. **International Journal Pharmacology**, v. 388, p.196-201, 2010.

HUE, L. R., MH. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor. **Essays Biochemistry**., v. 43, p. 121-37, 2007.

HUNG, C. F.; HSU, B. Y.; CHANG, S. C.; CHEN, B. H. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 98-105, 2012

HSIEH, Y.S.Y e HARRIS, P.J. Xyloglucans of Monocotyledons Have Diverse Structures. **Molecular Plant**, v. 2, n.5, p.943-65, 2009.

IHLUND, L. H., E.; KHAN, O.; SHOSHAN, MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. **Molecular Oncology**, v. 2, p. 94-101, 2008.

**INCA - INTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL)**. Disponível em: <<http://www.inca.com.br>> Acesso em: 15/07/2010.

**INCA - INTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL)** - Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil - Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>> Acesso em: 10/01/2012

ITOH, K., YAHABA, M., TAKAHASHI, A., TSURUYA, R., MIYAZAKI, S., DAIRAKU, M. In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **International Journal Pharmacology**, v. 356, p.95-101, 2008.

JEONG, A.S.C.; KOYYALAMUDI, S.R.; JEONG, Y.T.; SONG, C.H.; PANG, G. Macrophage Immunomodulating and Antitumor Activities of Polysaccharides Isolated from *Agaricus bisporus* White Button Mushrooms. **Journal Of Medicinal Food**., v. 15, n.1, p. 58-65, 2012

JIN, G.B.; HONG, T.; INOUE, S.; URANO, T.; CHO, S.; OTSU, K.; KITAHARA, M.; OUCHI, Y.; CYONG, J. C. Augmentation of immune cell activity against tumor cells by *Rauwolfia radix*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n. 3, p. 365-372, 2002.

JÓ, T.P., DF; BELTRAMINI, L.M.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M.R. Xyloglucan nano-aggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug. **Carbohydrate Polymers** v. 82 p. 355–362, 2010.

JUNGWIRTH, U.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K.; HARTINGER, C. G.; BERGER, W.; HEFFETER, P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 4, p. 1085-127, 2011.

KATO, Y.; UCHIDA, J.; ITO, S.; MITSUISHI, Y. Structural analysis of the oligosaccharides units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. **Intern Cong Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 161-164, 2001.

KAELLIN, W.G e THOMPSON, C.B. Clues from cell metabolism. **Nature**, v.465, p.562-65, 2010.

KANNA, P. S.; SARALAYA, M. G.; SAMANTA, K.; CHATTERJEE, M. Vanadium inhibits DNA-protein cross-links and ameliorates surface level changes of aberrant crypt foci during 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2005.

KATAGATA, Y.; KONDO, S. Keratin expression and its significance in five cultured melanoma cell lines derived from primary, recurrent and metastasized melanomas. **FEBS Lett**, v. 407, n. 1, p. 25-31, 1997

KELLY, P. The cancer critical care paradox. **Current Anaesthesia Critical Care**, 19:96–104, 2008.

KIM, Y. P., HW.; KIM, JH.; LEE, JY.; MOON, SH.; B, SHIN, CS. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. **Life Sciences** v. 79, p. 72-80, 2006.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005

KROEMER, G e POUYSSEGUR, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. **Cancer Cell**, v. 13, 2008.

LAHN, M.M.; SUNDELL, K. The role of protein kinase C-alpha (PKC- ) in melanoma. **Melanoma Research**., v. 14, p. 85-89, 2004.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v. 51, n. 9. p. 2520-2525, 2003.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters** ., v.105, p. 101–114, 2006.

LEVERKUS, M.; GOLLNICK, H. Bak (and Bax) to the future of primary melanoma Prognosis? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1212-1214, 2006.

LIMA, D.U., LOH, W., BUCKERIDGE, M.S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiology**, v. 42, p. 389-394, 2004.

LISBOA, C.G.S., TONINI, P.P., TINE, M.A.S., BUCKERIDGE, M.S. Endo-betamananase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 269-80, 2006.

LI W, YAJIMA T, SAITO K, NISHIMURA H, FUSHIMI T, OHSHIMA Y, *et al.* Immunostimulating properties of intragastrically administered *Acetobacter*-derived soluble branched (1,4)- $\alpha$ -D-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.72, p. 7005–11, 2004.

LI, Y. N., Y.; WU, H.; SUN, Y.; LI, Q.; KONG, X.; LIU, L.; MEI, Q. Modified Apple Polysaccharides Could Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. **Journal Food Science**, v. 75, n. 8, 2010.

LIMA SILVA, J.J.; GUIMARÃES, S.B.; SILVEIRA, E.R.; VASCONCELOS, P.R.L.; LIMA, G.G.; TORRES, S.M.; VASCONCELOS, R.C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesth Plastic Surgery**, v.33, p.104-09, 2009.

LISTON, P., FONG, W. G., KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptose: there is more to life than Bcl-2. **Oncogene**, v. 22, p. 8568-858, 2003.

LOGUE, S. E. E., M.; MARTIN, S. Annexin V has been widely used for the detection of apoptotic cells in vivo as well as in vitro. **NATURE PROTOCOLS** |, v. 4, n. 9, p. 1383-1395, 2009.

LU, Z. Nonmetabolic functions of pyruvate kinase isoform M2 in controlling cell cycle progression and tumorigenesis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 5-7, 2012

LUO, Q.S., Q.; WU, L.; YANG, Z. Structural characterization of an immunoregulatory polysaccharide from the fruiting bodies of *Lepista sordida*. **Carbohydrate Polymers**, 2012.

MACDONALD, F.; FORD, C.H.J. Molecular Biology of Cancer. **BIOS Scientific Publishers**: Oxford, 2000. p. 1-34.

MARKOVETS, A.H.D. Analysis of cancer metabolism with highthroughput technologies. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 10, 2011.

MARKS, R.. Epidemiology of melanoma. **Clinical Experimental Dermatology**. v.25:459-463, 2000.

MARTIN, K.R.; BROPHY, S.K. Commonly consumed and specialty dietary mushrooms reduce cellular proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 235, n. 11, p. 1306-14, 2010

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 39, p. 339-345, 1997.

MCKERNAN, D.P.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. "Killing the Blues": A role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? **Progress in Neurobiology**, v.88, p.246-63, 2009.

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.625-63, 1984.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 3d, p. 1005-1010, 1998.

MENDES, S.F.; SANTOS JR, O.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOSA, A.F.D.; ARANDA-SELVERIOA, G.; MONTEIRO, N.K.; DEKKERC, R.F.H.; PEREIRA, M.S.; TOVARD, A.M.F.; MOURÃO, P.A.S.; SILVAM, .L.C. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 45, p. 305-309, 2009.

MESHKINI, A.; YAZDANPARAST, R. Chemosensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 3, p. 334-42, 2010.

MICCOLI, L. et al. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. **Biochemistry Journal**, v. 313 ( Pt 3), p. 957-62, 1996

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MITCHELL, M.S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 80, p. 1445-1450, 1988.

MOLINUEVO, M. S. et al. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 163-72, 2004

MORENO-SANCHEZ, R.; RODRIGUES-ENRIQUEZ, S.; MARIN-HERNANDEZ, A.; SAAVEDRA, A. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS Journal**, v. 274, p. 1393–1418, 2007.

MORETAS, M.P.; ZAMPONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**. v. 93, p. 189-197, 2004.

MORINVILLE, A.M., D.; SHAVER, A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. **Trends Pharmacology Science**, v. 19, n. 11, p. 452-460, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. Amsterdam, v. 65, p. 55- 63, 1983.

MUELLER, E.A, ANDERER, F.A.; Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. **Cancer Research**, v.50, p.3646–51, 1990.

NAPOLITANO, M.J.; SHAIN, D.H. Quantitating adenylate nucleotides in diverse organisms. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 63, n. 1, p. 69-77, 2005

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, v. 15, p. 1070-1078, 2010.

NI, W.; ZHANG, X.; BI, H.; ITEKU, J.; JI, L.; SUN, C.; FANG, J.; TAI, G.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2512-8, 2009.

NIKOLAOU, V. S., AJ.; FLAHERTY, KT.; TSAO, H. Melanoma: New Insights and New Therapies. **Journal of Investigative Dermatology** v. 132, n. 1, 2012.

NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Curr Opin Colloid Interface Science**, v.8, p.396–400, 2003.

NISHINARI, K.; ZHANG, H.; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. **Curr Opin Colloid Interface Science**, v. 5, p. 195-201, 2000

NISHINO T, NISHIOKA C, URA H, NAGUMO T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carbohydrate Research**, v.255, p. 213–24, 1994.

NOBLIA, P.; VIEITES, M.; PARAJON-COSTA, B. S.; BARAN, E. J.; CERECETTO, H.; DRAPER, P.; GONZALEZ, M.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; AZQUETA, A.; LOPEZ DE CERAIN, A.; MONGE-VEGA, A.; GAMBINO, D. Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [VVO<sub>2</sub>(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 443-51, 2005

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L. M ; IACOMINI, M ; GORIN, PA J ; THOMAZ-SOCCOL, V ; OLIVEIRA, MBM . Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Netherlands, v. 233, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; NOSEDA, M.D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 749-57, 2009

OGAWA Y, INOMATA T, YOSHIDA S, MAEDA T, SEGUCHI H. Experimental study of the antitumor effect of Z<sup>-100</sup> in the treatment of MM46 tumor transplanted in C3H/He mice. 2. Effect of the combination therapy of radiation and long term administration of Z<sup>-100</sup>. **Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi**, v.24, p.51–6, 1989.

OKA, H.; EMORI, Y.; SASAKI, H.; SHIRAISHI, Y.; YOSHINAGA, K.; KURIMOTO, T. Anti-tumor mechanism of Z<sup>-100</sup>, an immunomodulatory Arabinomannan extracted from *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B, on pulmonary metastases of B16F10 melanoma: restoration of helper T cell responses via suppression of glucocorticoid-genesis. **Microbiology Immunology**, v.46, p. 343–51, 2002.

OOI, V.E.C e LIU, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. **Current Medical Chemistry**, v.7, p. 715-729, 2000.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p. 592-603, 2004.

OKADA M, MINAMISHIMA Y. The efficacy of biological response modifiers against murine cytomegalovirus infection in normal and immunodeficient mice. **Microbiology and Immunology**, v.31, p. 45–57, 1987.

ONWELUZO, J.C.; RAMESH, H.P.; THARANATHAN, R.N. Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 253-257, 2002.

PAIVA, E.A.S. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). C. R. **Biologies**, v. 332 p. 1078–1084, 2009.

PAN, J.G e MAK, T.W. Metabolic Targeting as an Anticancer Strategy: Dawn of a New Era? **Science Signaling**, v.381, p. 1-4, 2007.

PAN, J. S., L-C.; TAO, Y-F.; ZHOU, Z.; DU, X-L.; PENG, L.; FENG, X.; WANG, J.; LO, Y-P.; LIU, L.; WU, S-Y.; ZHANG, Y-L.; HU, S-Y.; ZHAO W-L.; ZHU, X-M.; LOU, G-L.; NI, J. ATP synthase ecto-a-subunit: a novel therapeutic target for breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, 2011.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. **Altured's Cosmetics & Toiletries**, v. 114, p. 65-78, 1999.

PEDERSEN, P. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. **Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 211-222, 2007.

PENG S.Y.; NORMAN J.; CURTIN G.; CORRIER D.; MCDANIEL H.R.; BUSBEE D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. **Molecular Biotherapy**, v.3, p. 79-87, 1991.

PENSO, J., BEITNER, R., Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, p. 113-117 1998.

PEREIRA DA SILVA, A. P. et al. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 3, p. 717-26, 2009

PERLIS, C; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **The oncologist.**, v.9, p.182-87, 2004

PETERSZEGLI, G. et al. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. **Biomedical Pharmacotherapy** v. 57, n. 5-6, p. 187-94, 2003

PETKOWICZ, C.L.O.; RECHIA,C.G.V.; BUSATO, A.P.; REICHER, F. Xiloglucanas: estrutura, propriedades e aplicações. *In*: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales iberoamericanos**. Ed. USP, São Paulo-SP. 2006

PICKLO, M.J., ZHANG, J., NGUYEN, V.Q. High-Pressure Liquid Chromatography Quantitation of Cytochrome c Using 393 nm Detection. **Analytical Biochemistry**, v.276, p.166-170. 1999.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.; ERRINGTON, N.; HARDING, S.E. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. **Biomacromolecules**, v.4, p.799-807, 2003

PLATHOW, C.; WEBER, W.A. Tumor Cell Metabolism Imaging. **Journal of nuclear medicine**, v.49, n.6, 2008.

POTOMATI, A., BUCKERIDGE, M.S. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 303-310, 2002.

PRIGNANO, F.; CORONNELLO, M.; PIMPINELLI, N.; CAPPUGI, P.; MINI, E.; GIANNOTTI, B. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 186, p. 183-192, 2002.



RAY, R. S.; BASU, M.; GHOSH, B.; SAMANTA, K.; CHATTERJEE, M. Vanadium, a versatile biochemical effector in chemical rat mammary carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 51, n. 2, p. 184-96, 2005

RAY, R.S.; GHOSH, B.; RANA, A.; CHATTERJEE, M. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. **International Journal Cancer**, v. 120, n. 1, p. 13-23, 2007

REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seed 'gums' and 'hemicelluloses'. **Advances in Botanical Research**, v. 11, p. 125–155, 1985.

RESENDES-ANTONIO, O.; CHECA, A.; ENCARNACIO, S. Modeling Core Metabolism in Cancer Cells: Surveying the Topology Underlying the Warburg Effect. **PLoS ONE**, v. 5, n.8, p. 1-11, 2010.

RICCI, M.S., ZONGM W,X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**. 11, 342-357, 2006.

RIGEL, D.S.; CARUCCI, J.A. Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st century. **CA Cancer Journal Clinical**, v. 50, p. 215-236, 2000.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.

RISTOW, M. Oxidative metabolism in cancer growth. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, v.9, p. 339–345, 2006.

ROMERO-GARCIA, S.; LOPEZ-GONZALEZ, J. S.; B. EZ-VIVEROS JL; AGUILAR-CAZARES, D.; PRADO-GARCIA, H. Tumor cell metabolism: An integral view. **Cancer Biology Therapy**, v. 12, n. 11, p. 939-48, 2011.

RONDEPIERRE, F.B.B.; BONNET, M.; MOINS, N.; CHEZAL, J.M.; D'INCAN, M.; DEGOU, F. B16 melanoma secretomes and in vitro invasiveness: syntenin as an invasion modulator. **Melanoma Research** v. 20, n. 2, 2010.

ROSÁRIO, M.M.T.; NOLETO, G.R.; BENTO, J.F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v.69, p. 464–472, 2008.

ROSARIO, M.M.; KANGUSSU-MARCOLINO, M.M.; DO AMARAL, A.E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chemico- Biological Interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 127-33, 2011

RUIZ-BRAVO A, JIMENEZ-VALERA M, MORENO E, GUERRA V, RAMOS-CORMENZANA A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p. 706–10, 2001.

SANCHEZ-CENIZO, L.; FORMENTINI, L.; ALDEA, M.; ORTEGA, A. D.; GARCIA-HUERTA, P. SANCHEZ-ARAGO, M.; CUEZVA, J. M. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25308-13, 2010

SANTOS JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p.231-38, 2010.

SCHEPETKIN, I.A e QUINM, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunology**, v. 6, p. 317– 333, 2006.

SCOTT, D. A.; RICHARDSON, A. D.; FILIPP, F. V.; KNUTZEN, C. A.; CHIANG, G. G.; RONAI, Z. A.; OSTERMAN, A. L.; SMITH, J. W. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 49, p. 42626-34, 2011

SEFEHRI, H.; ROGHANI, M.; HOUDEBINE, M.L.; Oral administration of pectinrich plant extract enhances C3 and C4 complement concentration in woman colostrum. **Reproduction Nutrition Development**., v.38, p. 255–60, 1998.

SERRONE, L.; HERSEY, P. The chemoresistence of human malignant melanoma: an update. **Melanoma Research**, v. 9, p. 51-58, 1999.

SILVEIRA, J.C. Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril* [dissertação de mestrado], **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, 2010.

DO AMARAL, AE. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (iv/v) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *leishmania in vitro*. [Dissertação de mestrado], **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, 2011.

SIMS, I.M.; MUNRO, S.L.A.; CURRIE, G.; CRAIK, D.; BACIC, A. Structural characterisation of xyloglucan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydrate Research**, v.293, p.147-72, 1996.

SHARMA, R. I. W., CRAIB S.;SMITH, T. A. D. [18F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Incorporation by MCF-7 Breast Tumour Cells In Vitro IsModulated by Treatment with Tamoxifen, Doxorubicin, and Docetaxel: Relationship to Chemotherapy-Induced Changes in ATP Content, Hexokinase Activity, and Glucose Transport. **International Journal of Molecular Imaging**, 2011.

SHAW, R.J. Glucose metabolism and cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, p.598–608, 2006.

SLAUGHTER, S.L.; ELLIS, P.R.; JACKSON, E.C.; BUTTERWORTH, P.J. The effect of guar galactomannan and water availability during hydrothermal processing on the hydrolysis of starch catalysed by pancreatic  $\alpha$ -amylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, p. 55– 63, 2002.

SMALLEY, K. S. M. e EISEN, T. G. Farnesyl Transferase Inhibitor SCH66336 is Cytostatic, Pro-Apoptotic and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Melanoma Cells. **International Journal Cancer**, v.105, p.165-175. 2003.

SOARES, S. S.; GUTIERREZ-MERINO, C.; AURELIANO, M. Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 5, p. 789-96, 2007

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SOLAINI, G.; SGARBI, G.; BARACCA, A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2010.

STUBBS, M E GRIFFITHS, J.R. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. **Advances in Enzyme Regulation**, v.50, p.44-55, 2010.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKAMI, P.R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects, **Food Chemistry**, v. 55, p. 259-264, 1996.

TANAKA, T.; DELONG, P.A.; KRUKLITIS, R.; LAPOOR, V.; KAISER, L.R.; ALBELDA, S.M. Treatment of lung cancer using clinically relevant oral doses of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib – potencial value adjuvant therapy after surgery. **Annals of Surgery**, v. 241, p. 168-78, 2005.

TENNANT, D.A.; DURÁN, R.V E GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. **Nature Reviews**, v.10, p. 267-77, 2010.

THETSRIMUANG, C. K., S.; CHIABLAEM, K.; SRISOMSAP, C.; SARNTHIMA, R. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lévl. **Food Chemistry** v. 128 p. 634–639, 2011.

TONINI, P.P., LISBOA, C.G.S., SILVA, C.O., MAZZONI-VIVEIROS, S.C, BUCKERIDGE, M. S. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata*, a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. **Trees**, v. 21, p. 13-21, 2007.

TUCCI, M.G.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; ZIZZI, A.; PUGNALONI, A.; GIACCHETTI, A.; RICOTTI, G.; BIAGINI, G. Involvement of E-cadherin, b-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **Dermatopathology**, v. 157, p. 1212–1216, 2007.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p. 523-533, 2000.

UGUREL, S. B., N.; SUCKER, A.; ZIMPFER, A.; RITTGEN, W.; SCHADENDORF, D. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 825-830, 2005.

VAYSSADE, M.; SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R.; DELAIGUE, C.; GOUNDIAM, O.; VIGNERON, P.; VORAGEN, A. G.; SCHOLS, H. A.; NAGEL, M. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 7, p. 982-9, 2010

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Quimica Nova**, v.25, n.2, p.273-286, 2002.

VERMEULEN, L.; SPRICK, M.R.; KEMPER, K.; STASSI, G.; MEDEMA, J.P. Cancer stem cells – old concepts, new insights. **Cell Death and Differentiation**, 15:947–958, 2008.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 17, p. 2769-76, 2011.

VIVES-BAUZA, C., YANG, L. e MANFREDI, G. Assay of Mitochondrial ATP Synthesis in Animal Cells and Tissues. In: L. A. PON e E. A. SCHON (Ed.). **Mitochondria**. San Diego: Elsevier, v.80, p.155-171, 2007.

YALIN, W.; ISHURD, O.; CUIRONG, S.; YUANJIANG, P.; Structure analysis and antitumor activity of (1→3)- $\beta$ -d-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Medicine**, v.71, p. 381–4, 2005.

YAMAMOTO, K.; KIMURA, T.; SUGITACHI, A.; MATSUURA, N. Anti-angiogenic and Anti-metastatic Effects of  $\beta$ -1,3-D-Glucan Purified from *Hanabiratake*, *Sparassis crispa*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 259-263, 2009.

YANG, W. P., F.; SHI, Y.; ZHAO, L.; FANG, Y.; HU, Q. Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes*. **Carbohydrate polymers** 2012.

YOON, T. K., T.J.; LEE, H.; SHIN, K.S.; YUN, Y.P.; MOON, W.K.; KIM, D.W.; LEE, K.H. Anti-tumor metastatic activity of  $\beta$ -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. **International Immunology** v. 8, p. 36-42,

YU, L. H., X.; PAN, Q.; YANG, L.; XU, Y.; ZHAO, G.; WANG, H.; WU, J.; LIU, K.; CHEN, J. Interactions between metal ions and carbohydrates. Syntheses and spectroscopic studies of several lanthanide nitrate–D-galactitol complexes. **Carbohydr Research**, v. 346, p. 2278-2284, 2011.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; VAN KESSEL, A.; GAJADHAR, A.A.; REDMOND, M.J.; LAARVELD, B. Beta-(1→3, 1→4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. **International Journal of Parasitology**, v.27, p. 329–37, 1997.

WANG, J. J.; SANDERSON, B. J.; ZHANG, W. Cytotoxic effect of xanthenes from pericarp of the tropical fruit mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) on human melanoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2385-91, 2011

WELJIE, A.M e JIRIK, F.R. Hypoxia-induced metabolics hifts in cancer cells: Moving beyond the Warburg effect. **Int J Biochem Cell Biol**, 2010.

WENNER, C. Targeting mitochondria as a therapeutic target in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 2, p. 450-456, 2012.

WHITNEY, S.E.C.; BRIGHAN, J.E.; DARKE, A.H.; REID, J.S.G.; GIDLEY, MJ. In vitro assembly o celuloase/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **The Plant. Journal.**, v.8, n.4, p.491-504, 1995.

WIJESINGHE, W. A. J. P. J., YOU-JIN. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.88, PAG. 13-20, 2012.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012

WOLF, A. A., S.; MICALLEF,J.; MUKHERJEE,J.; SABHA, N.; CAIRNS, R.; HAWKINS,C.; GUHA, A. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. **The Journal of Experimental Medicine** , v. 208, n. 2, p. 313-326, 2011.

WU, X. M., G.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; LIANG, L.; YANG, L. Isolation, purification and in vitro anti-tumor activity of polysaccharide from Ginkgo biloba sarcotesta. **Carbohydrate Polymers** v. 86, p. 1073-1076, 2011.

ZHANG, C. X.; HUANG, K. X. Mechanism of apoptosis induced by a polysaccharide, from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (MAP) in human hepatocellular carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, n. 3, p. 236-45, 2006.

ZHAO, Y. et al. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 371-8, 2010.

ZHAO, Y.; LIU, H.; RIKER, A. I.; FODSTAD, O.; LEDOUX, S. P.; WILSON, G. L.; TAN, M. Emerging metabolic targets in cancer therapy. **Front Biosci**, v. 16, p. 1844-60, 2011

ZHOU, S.T.; HUANG, C.; WEI, Y. The metabolic switch and its regulation in cancer cells. **Science China Life Sciences**, v..53, n.8, 2010.

XU, C. L., Y.; DONG, M.; WUD, X.; WANGE, X.; XIAO, Y. . Inhibitory effect of Schisandra chinensis leaf polysaccharide against L5178Y lymphoma. **Carbohydrate Polymers** 2011.